

PHOTOTOXISCHE KOMPLEMENTAKTIVIERUNG
BEI ERYTHROPOETISCHER PROTOPORPHYRIE

ARNO WEILER

1985

*Diss
offiziell
1985*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof.Dr.med.Dr.h.c. O. Braun-Falco

Phototoxische Komplementaktivierung bei
Erythropoetischer Protoporphyrrie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Arno Weiler

aus

München

Jahr 1985

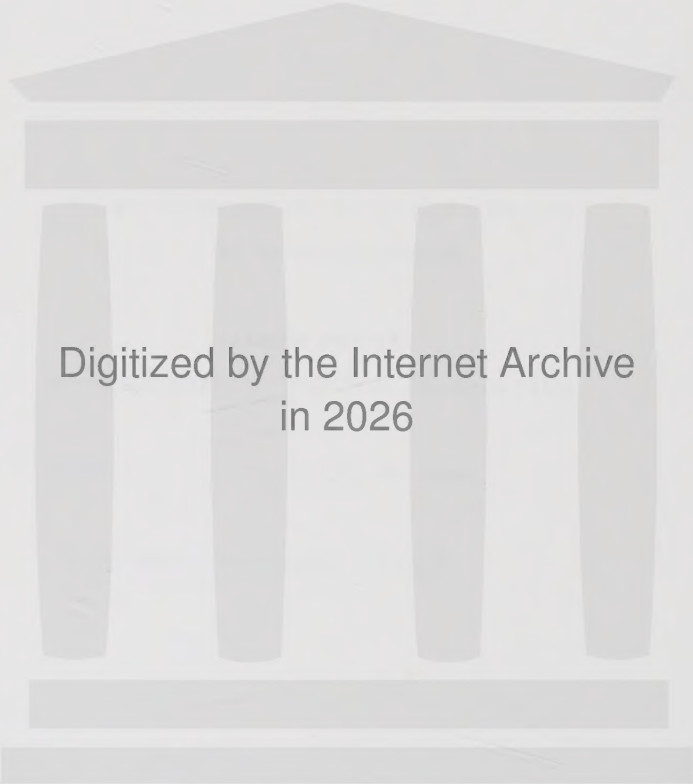
Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.Dr. O. Braun-Falco

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.85

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0040

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1. Erythropoetische Protoporphyririe
 - 1.2. Komplementsystem
 - 1.3. Ziele der Arbeit
2. Material und Methoden
 - 2.1. Phototoxische Komplementaktivierung im Serum von Patienten mit EPP
 - 2.1.1. Patientengut
 - 2.1.2. Gewinnen der Seren
 - 2.1.3. Bestrahlung der Seren
 - 2.1.4. Komplementbestimmungen
 - 2.2. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen
 - 2.2.1. Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin
 - 2.2.2. Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von vorbestrahltem Protoporphyrin
 - 2.2.3. Einfluß des Chelatbildners EDTA auf die phototoxische Komplementaktivierung
 - 2.3. Einfluß therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung
 - 2.3.1. Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin und beta-Carotin
 - 2.3.2. Versuche zur Therapie mit beta-Carotin
3. Ergebnisse
 - 3.1. Untersuchung in Patientenseren und Seren von Normalpersonen
 - 3.1.1. Bestimmung der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität
 - 3.1.2. Nachweis von C3-Spaltprodukten
 - 3.1.3. Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung von Komplementveränderungen
 - 3.1.4. Korrelation zwischen UV-induziertem Komplementverbrauch und Porphyrinspiegel im Serum der Patienten mit EPP
 - 3.1.5. Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Komplementkomponenten C3 und C4 nach phototoxischer Komplementaktivierung

- 3.2. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen
- 3.2.1. Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin
- 3.2.2. Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von vorbestrahltem Protoporphyrin
- 3.2.3. Einfluß des Chelatbildners EDTA auf die phototoxische Komplementaktivierung in vitro
- 3.3. Einfluß therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung
- 3.3.1. Untersuchung in Serum von Patienten mit EPP unter Therapie mit Carotinoiden
- 3.3.2. Untersuchung in Serum von Normalpersonen in vitro nach Zusatz von beta-Carotin
4. Diskussion der Versuchsergebnisse
5. Zusammenfassung
6. Literatur

1. EINLEITUNG

1.1. Erythropoetische Protoporphyririe

Die erythropoetische Protoporphyririe (im folgenden kurz EPP genannt) ist als eigenständiges Krankheitsbild erst seit 1953 bekannt, als Kosenow und Treibs einen Zusammenhang zwischen Lichtüberempfindlichkeit und Porphyrinämie beschrieben (57). Der Name EPP stammt von Magnus et al., welche zuerst eine eindeutige Beschreibung der Krankheit gegeben haben (71). Bei der EPP handelt es sich um ein nicht geschlechtsgebundenes, autosomal dominant vererbtes Stoffwechselleiden mit variabler Penetranz, das sich in einer Störung des Porphyrinmetabolismus manifestiert (48, 62, 97, 101, 105).

Biochemie:

Wichtigster Befund der EPP ist die erhöhte Protoporphyrinkonzentration in Erythrozyten, Serum und Fäces der Patienten (12, 50) als Folge einer Störung der Porphyrin-Häm-Biosynthese. Die erste Stufe der PP-Biosynthese besteht in der Bildung von delta-Aminolävulinsäure (ALA) aus Glycin und dem Succinyl-Coenzym A. Diese Stufe wird katalysiert durch das mitochondrische Enzym ALA-Synthetase, das geschwindigkeitsbegrenzend auf die Biosynthese von Häm wirkt. Die nächsten Stufen sind die Entstehung von Porphobilinogen, Uroporphyrinogen, Koproporphyrinogen, Protoporphyrinogen 9 und Protoporphyrin 9. Der letzte Schritt besteht im Einbau eines Eisenions (Fe^{2+}) in den Tetrapyrrolring, wodurch das Häm-Molekül entsteht (26). Dieser Schritt erfordert die Anwesenheit des mitochondrialen Enzyms Ferrochelatase. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden eine Verminderung der Ferrochelatase - Aktivität im Knochenmark (16), den Erythrozyten (42), Fibroblasten (13) und der Leber von Patienten mit EPP. Diese Resultate stützen die Hypothese, daß mangelnde Ferrochelataseaktivität der primäre Defekt der EPP sei. Die dadurch bedingte mangelnde Umwandlung von Protoporphyrin 9 in Häm führt über eine gleichzeitig vorhandene vermehrte ALA-Synthetase-Aktivität zu einer Anhäufung von Protoporphyrin 9. Aufgrund neuerer Arbeiten muß man annehmen, daß die übermäßige Protoporphyrinproduktion nicht nur, wie bisher angenommen im Knochenmark sondern auch in der Leber stattfindet.

Klinik:

Die EPP tritt meist schon im ersten Lebensjahrzehnt auf und ist die häufigste Lichtdermatose im Kindesalter. Nach Sonnenexposition kommt es innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden zu einem typischen, von den Patienten als höchst unangenehm empfundenen Brennen und Prickeln der Haut. Prädispositionsstellen sind alle lichtexponierten Stellen, für gewöhnlich also Hände und Gesicht, jedoch können sämtliche Körperpartien betroffen sein. Meistens kommt es 3 - 6 Stunden nach Strahleneinwirkung zur Ausbildung der Hauterscheinungen, die man in urtikariellen, dermatitischen, pruriginösen, Quincke-Typ und Hydroa-vacciniformen Typ einteilen kann (17). In seltenen Fällen findet man nach extremer Bestrahlung auch Bläschen, Bullae und Krustenbildung, jedoch sind diese Hauterscheinungen nicht typisch für die EPP (8, 62). Von praktischer Bedeutung ist, daß Fensterglas keinen Schutz bietet, sodaß diese Hautveränderungen nicht die Folge von UVB-Licht (280-320 nm) wie beim normalen Sonnenbrand sind, sondern daß langwelligeres UVA-Licht (320-400 nm) oder sichtbares Licht für die abnorme Reaktion verantwortlich ist. Im Laufe der Jahre entwickeln sich in befallener Haut chronische Veränderungen in Form von Narben und kleinen Papeln, die vor allem über den Fingergelenken und Handrücken zu einer verruciformen Verdickung der Haut führen (54). Die Haut kann verdickt und rauh sein, und an Myalinosis cutis erinnern. Weiterhin findet man eine wachsartige Veränderung der Haut besonders im Gesicht, welche ein lipoidproteinoseartiges Bild ergibt. Neben diesen Hauterscheinungen ist eine systemische Beteiligung sehr selten. Erwähnenswert ist eine Schädigung der Leber, die durch vermehrte Ausscheidung und Ablagerung von Protoporphyrin im Gallengangssystem bedingt ist. Es kann zu Cholestase, Cholelithiasis, Leberzelluntergang und zirrhotischem Umbau kommen. Diese Veränderungen haben bei etwa 10 % der Patienten mit EPP ein tödliches Leberkoma zur Folge (25, 62).

Histologie:

Mikroskopisch findet man bei EPP-Patienten in den Kapillärwänden der Dermis und perivaskulär ausgedehnte Depots von PAS-positivem, hyalinem Material, welches Braun-Falco 1964 als "eine pathologische Neukombination von Bindegewebsanteilen (z.B. Degeneration der Gefäßwand) und gewissen Komponen-

ten des Blutes" bezeichnet (18). In der Tat konnte in der chronisch lichtexponierten Haut von EPP-Patienten mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik perivaskuläre und intramurale Niederschläge von Plasmaproteinen nachgewiesen werden, insbesondere die Immunglobuline IgG und IgM, von Albumin, Fibrin und von den Komplementfaktoren C1q, C4, C3c, C5 und C9 (8, 9, 29, 47). Während der akuten Phase findet eine deutliche Infiltration von mononuklearen Zellen und von polymorphkörnigen Granulozyten zum Teil mit Leukozytoklase statt. Gleichzeitig zeigt sich eine deutliche Erythrodiapedese. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß sichtbares Licht in der Haut von Patienten mit EPP eine akute schwere Schädigung der oberflächlichen Kapillaren verursacht, die durch Endothelzelllücken mit darauf folgender Endothelzellennekrose charakterisiert ist. Auch in der akuten Phase können, wie in der chronisch veränderten Haut, immunfluoreszenzoptisch Ablagerungen von IgM und verschiedenen Komplementfaktoren in den Kapillärwänden nachgewiesen werden (s.o.). Elektronenmikroskopisch konnte von Ryan und Madill gezeigt werden, daß das perivaskulär abgelagerte hyalinartige Material in chronisch veränderter Haut bei EPP aus geschichtetem, teilweise fragmentiertem Basalmembranmaterial besteht, sowie aus fibrillärem Material, welches die Gefäßwände durchdringt und umgibt (100). Möglicherweise stellt es ein Transsudat aus dem Blut dar. Von Anton-Lamprecht und Meyer konnte ultrastrukturell eine Vervielfachung der kapillären Basalmembranstrukturen in der oberen Dermis nachgewiesen werden. Diese Autoren nehmen an, daß es sich bei den perivaskulären Ablagerungen bei EPP um exzessiv vermehrtes Basallamina-Material handelt, in dem möglicherweise auch Anteile von Transsudaten und degeneriertem Kollagen enthalten sind (5).

Diagnose:

Neben der typischen Anamnese und den Hautbefunden ist die wichtigste Suchreaktion zum Nachweis einer EPP die Erythrozytenfluoreszenz. Dazu wird ein Blutaussstrich angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es zeigt sich eine flüchtige hellrote Fluoreszenz des in den Erythrozyten abgelagerten Protoporphyrins. Da nur wenige vor allem jugendliche Erythrozyten diese Fluoreszenz zeigen, ist eine dreimal wiederholte Untersuchung zum Ausschluß einer EPP notwendig. Im Gegensatz zu anderen Porphyrinen zeigt der Urin

von EPP-Patienten keine Fluoreszenz, weil das Protoporphyrin nicht wasserlöslich ist und daher auch nicht im Urin ausgeschieden wird (24). Bestätigt wird der Nachweis der EPP durch den Nachweis von erhöhten Protoporphyrinspiegeln in Erythrozyten, Serum und Stuhl der Patienten.

Therapie:

Da eine kausale Therapie der EPP nicht möglich ist, muß man sich auf symptomatische und prophylaktische Behandlungsmaßnahmen beschränken. Wichtig ist, daß die Patienten zu starke Sonnenexposition meiden. Baart de la Faille et al berichten 1972 über Erfolge bei der Therapie mit oral verabreichten Carotinoiden (10). Von Mathews-Roth et al wurde 1977 beschrieben, daß die Lichtempfindlichkeit von EPP-Patienten mit einer beta-Carotindosis von 150 mg/Tag wesentlich vermindert werden konnte (79). Corbett et al. (1977) konnten jedoch keine schützende Wirkung von beta-Carotin während eines klinischen Versuchs mit Kontrollpersonen feststellen (23). Antimalariamittel, wie sie zur Therapie der PCT verwendet werden, finden bei der EPP wegen ihrer nicht gesicherten Wirkung kaum eine Anwendung. Die Therapie der EPP wird heutzutage mit beta-Carotin allein oder mit einem Kombinationspräparat aus beta-Carotin und Canthaxantin durchgeführt, üblicherweise nur in den Sommermonaten.

Pathogenese:

Die phototoxische Reaktion bei Patienten mit EPP ist bis heute noch nicht vollkommen geklärt. Es wird angenommen, daß die Hautveränderungen bei EPP mit einer photochemischen Schädigung von zellulären und mikrosomalen Membranen zusammenhängt, welche durch die Lichtaktivierung von Protoporphyrin in der Haut und den oberflächlichen dermalen Gefäßen bewirkt wird.

Den ersten experimentellen Beweis für die photosensibilisierende Eigenschaft der Porphyrine lieferte Meyer-Betz in einem heroischen Selbstversuch. Nach Injektion von 200 mg Hämatoporphyrin und anschließender Sonnenexposition kam es an den belichteten Körperpartien zu Erythem und ödematöser Schwellung (82). Verschiedene Arbeitsgruppen fanden, daß vor allem Licht der Wellenlänge 400 nm zu diesen Schädigungen führt (45, 70, 98, 11). Interessanterweise zeigt das Ab-

sorptionspektrum von Protoporphyrin ebenfalls bei 400 nm ein Maximum (s. Abb. 1). Bei dieser Wellenlänge wird das Protoporphyrin photoaktiviert und erfährt eine Umwandlung zu einem metastabilen Tripletzustand. In diesem angeregten Zustand kann PP entweder direkt mit Wasserstoffatomen von Molekülen reagieren (81) oder die Bildung von Sauerstoffradikalen bewirken (14, 107). Beide Vorgänge haben eine Schädigung von Zellmembranen und Zellbestandteilen zur Folge (41, 51, 103, 104). Goldstein und Harber zeigten, daß die Anregung der Porphyrine in Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung von Lipidperoxiden und Wasserstoffperoxiden führt, welche eine zellmembranschädigende Wirkung haben (44). Allison et al. machten die Bildung freier Radikale für diese Defekte verantwortlich (1). Die Membranschädigungen könnten in direktem Zusammenhang mit akuten und chronischen Veränderungen in der Haut von EPP-Patienten stehen.

Neben dieser direkten photochemischen Zellschädigung wurde 1980 von Gigli et al. ein weiterer Mechanismus für die Auslösung lichtabhängiger Hautveränderungen bei EPP vorgeschlagen. Wie bereits oben erwähnt, kann man während der akuten Phase der Reaktion Komplementfaktoren in der Haut von EPP-Patienten nachweisen. Gigli et al. zeigten, daß es im Serum von Patienten mit EPP nach Bestrahlung mit UVA zu einer Aktivierung des Komplementsystems kommt (40). Weiterhin fanden sie eine Abhängigkeit der Komplementaktivierung von der Höhe des Protoporphyrinspiegels im Serum (66). In Tierexperimenten konnten Lim und Gigli 1981 nachweisen, daß mit Porphyrin vorbehandelte Meerschweinchen nach UVA-Bestrahlung sowohl klinische Hautveränderungen im Sinne einer EPP zeigten als auch eine Abnahme der hämolytischen Aktivität von Komplement im Serum aufwiesen (66). Die gleichen Autoren fanden in uroporphyrinhämischen Serum und in Serum von Patienten mit EPP (69) nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 405 nm eine Zunahme der Komplementabhängigen chemotaktischen Aktivität (68).

Alle diese Arbeiten untermauern die These einer Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese der EPP. Das folgende Kapitel gibt einen kurzen Überblick über klassische und alternative Komplementaktivierung.

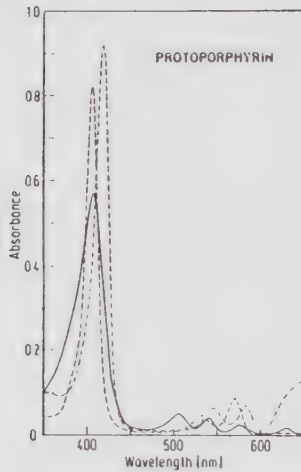


Abb. 1: Absorptionsspektrum von Protoporphyrin-IX-dimethylester (3,5 mol(l) in Chloroform (—), als Kupfer- (----) und als Zink-Chelat (-.-.-). (nach Doss)

1.2. Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein grundlegender Bestandteil des natürlichen Abwehrsystems unseres Körpers. Es besteht aus annähernd 20 Proteinen, die etwa 10 % der Serumglobulinfraction ausmachen. Die Aktivierung dieses Systems kann durch eine Vielzahl von natürlich vorkommenden oder synthetischen Substanzen ausgelöst werden und erfolgt stufenweise auf zwei unterschiedlichen Wegen, dem sogenannten klassischen und dem alternativen Aktivierungsweg.

Der klassische Aktivierungsweg umfaßt die Komponenten C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3 und C5 und wird durch die Bindung von C1q an Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelöst (6). Die Komponenten C1r und C1s sind Proenzyme, die durch limitierte Proteolyse in aktive Enzyme gespalten werden. Die Komponenten C4 und C2 stellen die natürlichen Substrate dieser Enzyme dar (37). Durch die limitierte Proteolyse von C4 und

Enzyme dar (37). Durch die limitierte Proteolyse von C4 und C2 entsteht ein bimolekularer Mg^{2+} -abhängiger Komplex C4b2a (C3 Konvertase) mit enzymatischer Aktivität für C3 (15, 88, 94). Nach der proteolytischen Spaltung von C3 kann ein neuer Enzymkomplex C4b2a3b (C5-Konvertase) gebildet werden, der C5 in C5a und C5b spalten kann (108). Der alternative Aktivierungsweg umfaßt eine Gruppe von Proteinen (C3, C3b, Faktor B, Faktor D und Properdin), die in Abwesenheit von Antigen-Antikörperkomplexen und den klassischen Komponenten C1, C4 und C2 ebenfalls die Proteolyse und Aktivierung von C3 und C5 bewirken können (87). Als Auslöser kommen u.a. Endotoxine gramnegativer Bakterien (32), Bestandteile von Hefezellen wie Zymosan (31, 63, 93), aggregiertes IgA (92) und Dextrane in Frage.

Die Endphase der Komplementaktivierung von C6 bis C9 verläuft in beiden Aktivierungswegen identisch: Durch das Fragment C5b wird die nichtenzymatische Bildung eines zytolytischen, makromolekularen Komplexes C5b6789 ermöglicht. Dieser Komplex, der auch als "membrane attack complex" (MAC) bezeichnet wird, reagiert mit Zellmembranbestandteilen und kann somit zur Zytolyse führen (56). In Abb. 3 sind klassischer und alternativer Aktivierungsweg noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Die biologische Aktivität des Komplementsystems ist jedoch nicht auf die Bildung des MAC beschränkt. Von wesentlicher pathophysiologischer Bedeutung ist die Freisetzung von biologisch aktiven Spaltprodukten während der Komplementaktivierung durch die limitierte Proteolyse der Komponenten C3 und C5 (22, 64, 86, 113). Die dabei entstehenden Anaphylatoxine C3a und C5a sind hochaktive Peptide, die permeabilitätssteigernd wirken, glatte Muskulatur kontrahieren und Histamin aus Mastzellen und Basophilen freisetzen können. Das C5a Fragment wirkt zusätzlich chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten (22, 64, 86, 113). Das bei der C3-Spaltung ebenfalls anfallende C3b Fragment wird von dem C3b-Inaktivator und dem Kofaktor H in ein Intermediärprodukt C3bi verwandelt, das enzymatisch in die Fragmente C3c und C3d gespalten wird (99). Durch die immunochemische Messung der C3c- und C3d- Spaltprodukte kann die Aktivierung von C3 im Serum nachgewiesen werden.

Spezifische Rezeptoren für die Fragmente von C3 und C4 befinden sich auf fast allen Zellen des strömenden Blutes, wie Erythrozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, und auf bestimmten Epithelzellen (39). Die Reaktion dieser sogenannten Immunadhärenzrezeptoren mit den Komplementfragmenten C3b, C3d, C3c und C4b kann eine Reihe zellulärer Funktionen auslösen und beeinflussen. So z.B. stimuliert C3b die Phagozytose von Fremdpartikeln und die Freisetzung von lysosomalen Enzymen aus Makrophagen und aus neutrophilen Granulozyten.

1.3. Zielsetzung

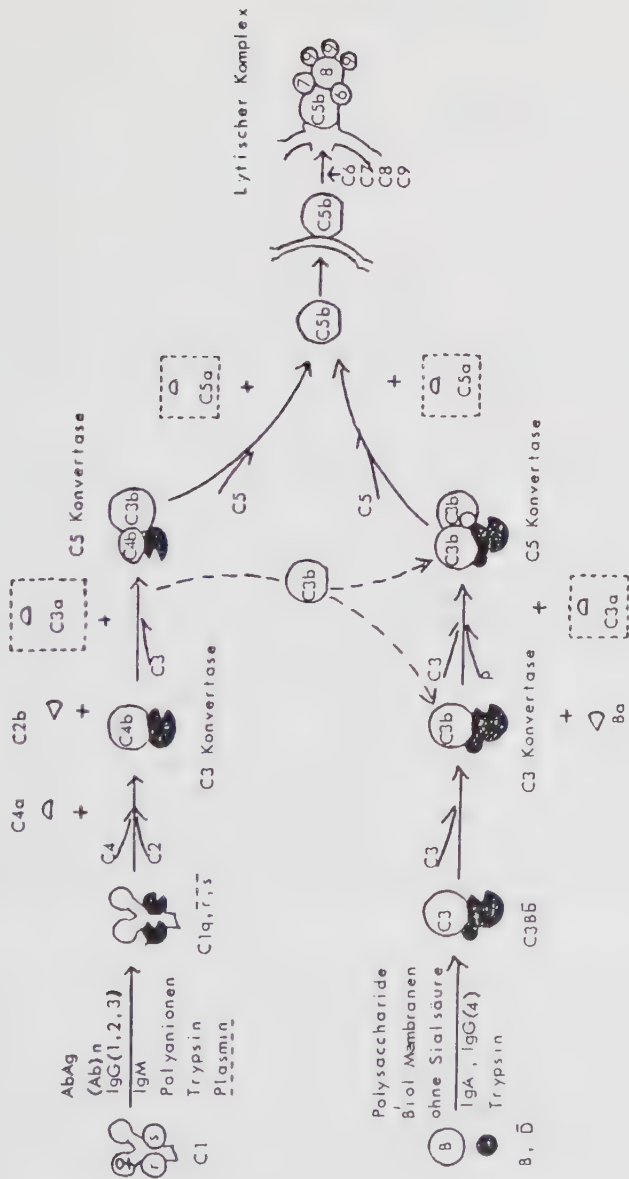
In dieser Arbeit wird die Wechselwirkung zwischen langwelligem UV-Licht, Porphyrinen und dem Komplementsystem im Serum von Patienten mit EPP sowie in Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin aufgezeigt.

Es wird untersucht in welchem Ausmaß die lichtabhängige Komplementaktivierung von der Bestrahlungsdosis und der Protoporphyrinkonzentration im Serum abhängt.

Es wird überprüft, ob die UVA-induzierte Komplementaktivierung durch Lichtschutztherapie beeinflusst werden kann.

An Hand der gewonnenen Ergebnisse wird diskutiert, ob die lichtinduzierte Komplementaktivierung am Pathomechanismus der Hautveränderungen bei EPP beteiligt ist.

K L A S S I S C H E K O M P L E M E N T A K T I V I E R U N G



A L T E R N A T I V E K O M P L E M E N T A K T I V I E R U N G

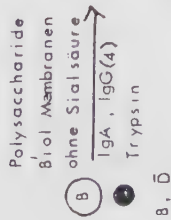


Abb. 2: Schema der Komplementaktivierung über klassischen und alternativen Weg.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Phototoxische Komplementaktivierung im Serum von Patienten mit EPP

2.1.1. Patientengut

Die Untersuchung wurde im Serum von 12 Patienten mit EPP aus der Dermatologischen Universitätsklinik München (Nr. 10-12) und der Hautklinik der Universität Düsseldorf (Nr. 1-9) durchgeführt. Die Diagnose EPP wurde anhand der typischen Hautveränderungen und der biochemischen Befunde mit erhöhten Porphyrinspiegeln in Serum und Erythrozyten gestellt.

Das Patientengut bestand aus 6 weiblichen und 6 männlichen Personen im Alter von 9 bis 62 Jahren. Das Durchschnittsalter zur Zeit der Blutentnahme betrug 33 Jahre. Bei sämtlichen Patienten besteht die Erkrankung seit früher Kindheit. Bei einem Patienten (Nr. 4) bestanden nur subjektive Empfindungen wie Brennen und Jucken, jedoch keine Hautsymptomatik (PT+), bei sieben Patienten (Nr. 2, 3, 5, 6, 7, 8 und 11) zeigte die lichtexponierte Haut Erythem und leichtes Ödem (PT++), und bei vier Patienten (Nr. 1, 9, 10 und 12) ausgeprägte ödematöse Schwellung, Blasenbildung und Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens (PT+++). Zur Diagnose-sicherung wurde der Porphyrinspiegel in Serum und Erythrozyten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ermittelt (27). Für die Durchführung der Bestimmungen möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Doss, Universität Marburg (Patienten 10-12) und Herrn Prof. Dr. G. Goerz, Hautklinik der Universität Düsseldorf (Patienten 1-9) herzlich danken.

Aufgrund der im Serum gemessenen Porphyrinspiegel (siehe Tab. 1, Spalte 5) kann man drei Gruppen von Patienten unterscheiden:

- A) 3 Patienten (Nr. 1, 5 und 6) mit einem grenzwertig erhöhten Porphyrinspiegel von weniger als 1 $\mu\text{g/dl}$ Gesamtporphyrine im Serum (Normalwert bis 0,5 $\mu\text{g/dl}$)
- B) 6 Patienten (Nr. 2, 3, 4, 8, 10 und 11) mit einem Porphyrinspiegel zwischen 1 $\mu\text{g/dl}$ und 10 $\mu\text{g/dl}$

C) 3 Patienten (Nr. 7, 9 und 12) mit stark erhöhtem Gesamt-Porphyrinspiegel von über 10 ug/dl im Serum

Bei 9 Patienten fand sich ein deutlich erhöhtes Gesamtporphyrin von mehr als 1000 ug/dl in den Erythrozyten. 10 der 12 Patienten standen zum Zeitpunkt der Untersuchung unter einer mehrmonatigen Therapie. Neun erhielten ein Kombinationspräparat mit einem Anteil von 10 mg beta-Carotin und 15 mg Canthaxantin pro Kapsel. Davon wurden vier Patienten (Nr. 5, 6, 8 und 9) mit zwei Kapseln pro Tag, vier Patienten (Nr. 1, 2, 3 und 4) mit drei Kapseln pro Tag, und ein Patient (Nr. 7) mit vier Kapseln (entspricht einer Dosis von 40 mg beta-Carotin und 60 mg Canthaxantin) pro Tag therapiert. Patient Nr. 11 wurde ausschließlich mit beta-Carotin in einer Dosierung von 150 mg pro Tag behandelt. Bei diesem Patienten wurde vor Therapiebeginn und nochmal nach sechswöchiger Therapie Blut entnommen. Die Patienten 1, 3 und 5 erhielten zusätzlich 2 x 125 mg Chloroquin pro Woche. Die Patienten 10 und 12 waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme ohne Therapie.

In sämtlichen Seren wurden die beta-Carotin- und Canthaxantinspiegel mit Hilfe der HPLC-Methode bestimmt (s. Tab. 1 Spalte 8 und 9). Für die Durchführung dieser Bestimmungen möchte ich mich bei Herrn Dr. Hennes, Abteilung klinische Prüfung und Entwicklung der Firma Hoffmann La Roche in Grenzach-Wyhlen bedanken.

Nach therapeutischen Gesichtspunkten wurden die Patienten daher in drei Gruppen eingeteilt:

- A) 2 Patienten (Nr. 10 und 12) ohne Therapie
- B) 7 Patienten (Nr. 2, 4, 6, 7, 8, 9 und 10), die ausschließlich mit Carotinoiden behandelt wurden
- C) 3 Patienten (Nr. 1, 3 und 5), die Carotinoide und Chloroquin erhielten.

Eine Kontrollgruppe zu den Patienten wurde aus sechs Normalpersonen gebildet. Ein Proband unterzog sich zu Versuchszwecken freiwillig einer sechswöchigen Therapie mit 100 mg beta-Carotin/Canthaxantin pro Tag. Vor Therapiebeginn und nach Beendigung der Therapie wurde Blut abgenommen und die lichtinduzierbare Komplementaktivierung im Serum bestimmt.

Tabelle 1: Patientengut

Nr.	Patient	Geburts-jahr	Krankheit besteht seit	Stärke der Hautreaktion	Porphyrine im Serum (ug/dl)	Porphyrine im Erythrozyt (ug/dl)	Therapie	beta-Carotin im Serum (ug/dl)	Canthaxantin im Serum (ug/l)
1	D.A. ♂	1964	2. Lebens-jahr	++	0,5	1445	75 mg Carotin 2x125mg Resochin	3940	2200
2	J.B. ♂	1966	4. Lebensj.	+	9,3	787	75 mg Carotin	470	50
3	H.B. ♂	1963	4. Lebensj.	++	3,6	1350	75 mg Carotin 2x125mg Resochin	410	-
4	M.B. ♀	1969	2. Lebensj.	+	4,3	1543	75 mg Carotin	3345	2200
5	C.P. ♀	1967	5. Lebensj.	++	0,6	242	50 mg Carotin 2x125mg Resochin	2740	1820
6	E.R. ♂	1925	6. Lebensj.	++	0,5	653	50 mg Carotin	550	280
7	K.S. ♀	1921	3. Lebensj.	++	16,0	2438	100 mg Carotin	1605	360
8	H.V. ♂	1939	4. Lebensj.	++	4,0	1563	50 mg Carotin	1855	1250
9	M.W. ♀	1937	2. Lebensj.	+++	20,0	1554	50 mg Carotin	5195	980
10	R.L. ♂	1943	4. Lebensj.	+++	9,7	1624	-	90	-
11	M.B. ♀	1974	2. Lebensj.	++	6,1	1100	150 mg Carotin	6655	-
12	E.B. ♀	1934	Kindheit	+++	10,7	1443	-	120	-

2.1.2 Gewinnen der Seren

Durch Venenpunktion gewonnenes Patientenblut wird in lichtgeschützte Reagenzgläser gefüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur und eine Stunde im KÜHLSCHRANK bei 4 Grad Celsius belassen. Danach wird es zehn Minuten bei 3600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Überstehende Serum wird in Fraktionen a 1 ml aufgeteilt und bei minus 70 Grad Celsius gelagert.

2.1.3 Bestrahlung der Seren

Bestrahlungsquelle:

Als Bestrahlungsquelle diente das UVA SUN 5000 (89) der Firma Mutzhas München mit maximaler Strahlungsenergie im Bereich von 320 - 460 nm. Es enthält eine mit Argon und Quecksilber gefüllte Quarzlampe mit einer Betriebstemperatur von 900 Grad Celsius. Das spezielle Quarz der Lampe dient als UVC-Filter. Ein blau-violett Filter von ein mm Dicke absorbiert das sichtbare Licht oberhalb von 460 nm und einen Teil der UVB-Strahlung. Ein zusätzlicher 6 mm dicker Infrarotfilter absorbiert den Infrarotanteil und reduziert ebenfalls UVB.

In einer Entfernung von 0,2 m gibt das UVA SUN 5000 auf einer Fläche von $0,35 \times 0,35 \text{ m}^2$ eine UVA-Intensität von ungefähr 1400 Watt pro Quadratmeter ab. Abb. 3 zeigt den relativen Energieausstoß in Abhängigkeit von der Wellenlänge. 84 % der insgesamt abgegebenen Energie liegt im Bereich des UVA-Lichtes mit der Wellenlänge von 320 - 400 nm, 16 % im Bereich von 400 - 460 nm.

Material:

- Centra UV-Meßgerät 1071
- geschlossene Plexiglasschalen mit 5,5 cm Durchmesser und 1,5 cm Höhe

Durchführung:

a) Festlegung der Bestrahlungsbedingungen:

Der Meßkopf des UV-Meßgerätes wird in 40 cm Abstand zum UVA-SUN 5000 angebracht. Mit einer Stoppuhr werden die Zeiten gemessen, die jeweils notwendig sind, um eine Energie von 5, 10 und 50 Joule/cm² UVA in dieser Entfernung zu erreichen. Dieser Vorversuch wird zu Beginn jedes Versuchstages wiederholt.

b) Bestimmung der Lichtabsorption der Plexiglasbehälter

Die Plexiglasbehälter, in denen sich das Serum während der Bestrahlung befindet, absorbieren ein bestimmtes Quantum an UVA-Licht. Um diesen Anteil zu ermitteln, wird der Meßkopf des UV-Meßgerätes in 40 cm Abstand zum UVA-SUN 5000 angebracht und die Zeit ermittelt, die notwendig ist um 1 J/cm² UVA zu erreichen. In einem weiteren Versuchsdurchgang wird der Meßkopf mit dem Deckel der Plexiglasbehälter abgedeckt und ebenfalls die Zeit gestoppt. Aus der Differenz der beiden Zeiten kann man errechnen, daß circa 10 % der Strahlungsenergie absorbiert wird. Dies muß man bei der folgenden Bestrahlung der Patientenseren berücksichtigen.

c) Bestrahlung der Patientenseren mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA

Je 1 ml eines Patientenserums werden in 5 Plexiglasschalen gegeben, der Deckel aufgesetzt und mit Leukosilk wasserdicht verschlossen. Die mit Serum gefüllten Plastikschenkel werden im Abstand von 40 cm zum UVA-SUN 5000 auf eine mit Eis gefüllte Plastikwanne gelagert, um eine zu starke Erwärmung der Seren während des Bestrahlungsvorgangs zu vermeiden. Serumprobe 1, 2 und 3 werden mit jeweils 5, 10 und 50 J/cm² UVA bestrahlt. Die entsprechenden Bestrahlungszeiten wurden im Vorversuch ermittelt (s.o.). Probe 4 wird während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA mit einem lichtundurchlässigen Tuch abgedeckt und dient als lichtgeschützte Kontrolle. Probe 5 wird nicht in den Bestrahlungsvorgang einbezogen und dient als unbestrahlte Kontrolle.

Nach Abschluß der Bestrahlung wird der Inhalt jeder Plexi-
glasschale in zwei Fraktionen a 0,5 ml aufgeteilt, in Eppen-
dorfröhrchen pipettiert und bei minus 70 Grad Celsius aufbe-
wahrt.

Alle Pipettierarbeiten mit Patientenserum wurden in einem
abgedunkelten Raum unter Rotlicht verrichtet, um eine Ver-
fälschung der Ergebnisse durch Sonneneinstrahlung oder
Künstliches Licht zu vermeiden.

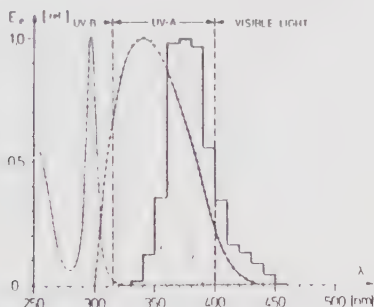


Abb. 3: Relative Strahlungsenergie des UVA-SUNS 5000 im
Bereich von 320 - 460 nm. Wirkungsspektrum für UVB-
induzierte Erytheme (—, —, —) und UVA-induzierte So-
fortpigmentierung (- -). (nach 89)

2.1.4. Komplementbestimmungen

Die Komplementbestimmung in den bestrahlten Patientenserum
und Normalserum erfolgte nach folgenden Methoden:

- Bestimmung der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität (CH 50) durch quantitative molekulare Titration nach der Methode von Rapp und Borsos (96) und
- Immunochemischer Nachweis der proteolytischen Spaltung von C3 durch die zweidimensionale, gekreuzte Immunelektrophorese (CIEP) nach der Modifikation von Laurell (61)
- In einigen ausgewählten Seren wurde zusätzlich die Proteinkonzentrationen der Komplementfaktoren C3 und C4 mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Mancini gemessen (72).

Methode 1: Bestimmung der Gesamtkomplementaktivität im Serum
(CH 50)

Prinzip:

Eine standardisierte Menge von Schafserythrozyten wird mit Anti-Schaf-Hämolsin sensibilisiert. Diese werden mit verschiedenen Verdünnungen einer Serumprobe inkubiert. Die Anwesenheit von aktiven Komplement im Serum führt zu einer konzentrationsabhängigen mehr oder weniger stark ausgeprägten Lyse der Schafserythrozyten. Das Ausmaß der Hämolyse wird durch spektrophotometrische Messung des freigesetzten Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 414 nm bestimmt. Als hämolytische Gesamtkomplementaktivität wird die Serumverdünnung angegeben, welche zu einer 50 %-igen Hämolyse der sensibilisierten Schafserythrozyten führt (CH 50).

Material:

- 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz, Merck, Art.Nr. 6318
- 5,5 Diäthylbarbitursäure, Merck, Art.Nr. 276
- 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung
- Gelatine für die Mikrobiologie, Merck
- 0,1 M EDTA-Lösung (hergestellt aus Titriplex III, Merck, Art.Nr. 8418)
- Hammelblut konserviert, Behring Institut, K.Nr. 303053
- Amboceptor 6000, Anti-Sheep Hemolysin (polyvalente Antikörper) Behringwerke K.Nr. 302126 C
- Meerschweinchen Komplement konserviert, Behringwerke, K.Nr. 303157

Verwendete Puffer:

Die Komplementpuffer wurden nach Nelson et al. (90) hergestellt.

- Veronalpuffer (5 x conc.)

83 g NaCl
10,19 g 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz
34,58 ml 1 N HCL

auf 2000 ml mit aqua dest. auffüllen und den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

- Gelatinehaltiger Veronalpuffer (GVB⁻⁻)

200 ml Veronal 5 x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)

auf 1000 ml mit aqua dest. auffüllen

- Gelatinehaltiger Veronalpuffer mit Mg₂₊ und Ca₂₊ (GVB⁺⁺)

200 ml Veronal 5 x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)
5 ml 0,03 M CaCl₂-Lösung
5 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung

auf 1000 ml mit aqua dest. auffüllen

- Gelatinehaltiger Veronalpuffer mit EDTA-Zusatz (0,01 M GVB⁻⁻)

200 ml Veronal 5 x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)
100 ml 0,1 M EDTA-Lösung

auf 1000 ml mit aqua dest. auffüllen

- Isotoner Gelatine/Veronalpuffer von halber Osmolalität (DGVB⁺⁺)

200 ml Veronal 5 x conc.
10 ml 0,03 M CaCl₂-Lösung
50 g Glucose
10 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung

auf 2000 ml mit aqua dest. auffüllen

Alle mit Gelatine hergestellten Puffer müssen täglich erneuert werden.

Durchführung:

- a) Herstellen einer standardisierten Erythrozytensuspension von 1×10^9 Zellen

10 ml Hammelblut werden 2 x mit 0,9%iger NaCl-Lösung und 2 x mit GVB⁺⁺-Puffer gewaschen und mit demselben auf 50 ml resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wird mit 25 ml aqua dest. lysiert und im Beckmann DB-Spektrophotometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 541 nm bestimmt. Eine Extinktion von 0,42 entspricht der gewünschten Erythrozytenkonzentration von 1×10^9 Zellen/ml. Weicht die gemessene Extinktion von diesem Wert ab, so wird das korrekte Endvolumen nach folgender Formel berechnet und entsprechend korrigiert.

$$\text{Endvolumen (ml)} = \frac{\text{gemessene Extinktion}}{0,42} \times 50 \text{ ml}$$

- b) Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Sensibilisierung der Erythrozyten für Komplement

Durch Lösen von 0,2 ml Ambozeptor 6000 in 5 ml GVB⁺⁺ wird eine Hämolyisinverdünnung von 1:25 hergestellt. Mit einer Verdünnungsreihe werden weitere Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:200; 1:400 und 1:800 hergestellt. 0,25 ml Meer-

schweinchekomplement werden mit GVB⁺⁺ auf 25 ml aufgefüllt, was eine Konzentration von 1:100 ergibt.

Die folgenden Schritte werden für jede Hämolysinverdünnung doppelt ausgeführt:

0,5 ml der standardisierten Erythrozytensuspension werden jeweils 0,5 ml Hämolysinverdünnung zugegeben und die Mischung 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es werden 5,5 ml GVB⁺⁺ und 1 ml der 1:100 Komplementverdünnung zugefügt und nochmals unter ständigen Schütteln 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Parallel dazu erfolgt das Ansetzen der Kontrolllösungen nach folgendem Schema.

	K1	K2	K3
Erysuspension (ml)	0,5	0,5	0,5
Hämolysinverdünnung 1:25 (ml)	0,5	---	0,5
10 min. bei 37°C inkubieren			
GVB ⁺⁺ (ml)	6,5	6,0	---
H ₂ O dest. (ml)	---	---	7,0
Komplementverdünnung 1:100 (ml)	---	1,0	---
60 min. bei 37°C inkubieren			

K1 und K2 sind Leerkontrollen und zeigen die unbeeinflussbare Spontanhämolyse an. K3 ist die Kontrolllösung mit 100%iger Hämolyse.

Nach Abschluß der Inkubation werden die Reaktionsmischungen 10 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert, der Überstand jeweils in Quarzglas kuvetten dekantiert und im Spektrophotometer die Extinktion bei 541 nm gemessen. Aus dem Mittelwert von K1 und K2 wird die Leerextinktion berechnet. Diese wird vom jeweils gemessenen Extinktionswert subtrahiert. Man dividiert diesen Wert durch die 100 % Kontrolle K3 und erhält die Hämolyse rate in Prozent. Diese Schritte sind in folgender Formel zusammengefaßt:

$$\text{Hämolyse (\%)} = \frac{\text{gemessene Extinktion} - \text{Leerextinktion}}{\text{K3-Extinktion}} \times 100 \%$$

Die Auswertung des Versuches wird anhand des folgenden Beispiels erläutert:

In einem Versuch wurden folgende Extinktionswerte gemessen:

Hämolysinverdünnung		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Extinktion bei 541 nm	A	0,370	0,465	0,485	0,460	0,425	0,345
	B	0,330	0,445	0,505	0,480	0,430	0,330
Extinktion minus Leerkontrolle	A	0,360	0,455	0,475	0,450	0,415	0,335
	B	0,320	0,435	0,495	0,470	0,420	0,320
Hämolysen (%)	A	59,02	74,92	77,87	73,77	68,03	59,83
	B	52,46	71,31	81,15	77,05	68,85	52,46

Für die Kontrollen ergaben sich folgende Werte:

K1: 0,010; 0,009 K2: 0,012; 0,010 K3: 0,610; 0,610

Der Mittelwert aus K1 und K2 beträgt 0,010.

Auf Millimeterpapier werden die Hämolysenwerte auf der Abszisse und die entsprechenden Hämolysinverdünnungen auf der Ordinate eingetragen, und die Punkte miteinander verbunden. Es resultiert eine parabelförmige Kurve mit einem Maximum bei einer Hämolysinverdünnung von 1:100. (S. Abb. 4). Im aufsteigenden Teil der Kurve bei Ambozeptorkonzentrationen von 1:25 und 1:50 liegt ein Überschuß von Hämolysin vor. Es kommt zur Aggregation von Erythrozyten, welche somit nicht mehr von Komplement lysiert werden können. Im absteigenden Teil der Kurve bei Konzentrationen von 1:200 bis 1:800 sind nicht alle Erythrozyten mit Ambozeptor beladen und können daher ebenfalls nicht lysiert werden. Am Scheitelpunkt der Parabel, an dem eine maximale Hämolysen vorliegt, besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Hämolysin, Erythrozyten und Komplement. Die optimale Sensibilisierung der Schafserythrozyten erfolgt also bei einer Hämolysinverdünnung von 1:100.

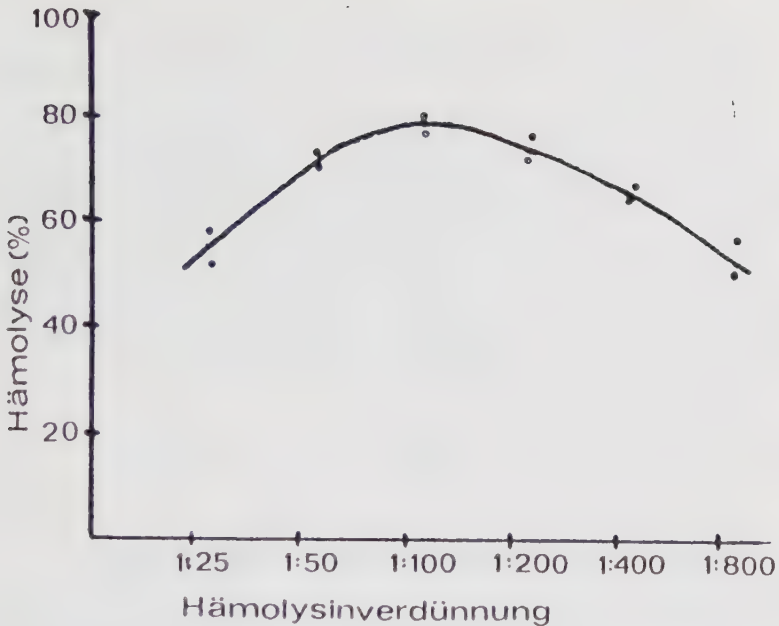


Abb. 4: Bestimmung der optimalen Hämolysinverdünnung für die Sensibilisierung der Schafererythrozyten.

Sensibilisierung der Hammelerythrozyten (EA)

Man stellt nach der unter a) beschriebenen Methode 50 ml einer standardisierten Erythrozytensuspension mit 1×10^9 Zellen/ml her, wäscht zweimal in GVB^{--} und resuspendiert mit dem gleichen Puffer auf 50 ml. Die standardisierten Erythrozyten werden mit 50 ml einer 1:100 Verdünnung von Ambozeptor in GVB^{--} gemischt und unter ständigem Rühren 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Erythrozyten 2 x in DGVB^{++} gewaschen und auf 50 ml Endvolumen resuspendiert. DGVB^{++} ist glucosehaltig und dient als Aufbewahrungspuffer. Die sensibilisierten Erythrozyten werden im Folgenden mit "EA" bezeichnet.

d) Herstellen der Gebrauchslösung von EA

Für die Durchführung des hämolytischen Assays ist eine Erythrozytenkonzentration von 1×10^8 Zellen/ml notwendig. 10 ml der sensibilisierten Erythrozyten werden 2 x mit GVB⁺⁺ gewaschen und mit demselben auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht. Daraus werden 0,5 ml entnommen, mit 7 ml aqua dest. lysiert und in einem Spektrophotometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 414 nm bestimmt. Ergibt sich dabei ein Wert von 0,60, so hat man die gewünschte Erythrozytenkonzentration von 1×10^8 Zellen/ml. Bei Abweichen von diesem Wert wird das korrekte Endvolumen nach folgender Formel berechnet und entsprechend korrigiert.

$$\text{Endvolumen (ml)} = \frac{\text{gemessene Extinktion}}{0,60} \times 100 \text{ ml}$$

e) Durchführung der hämolytischen Komplementtitration

0,2 ml Serumprobe werden mit GVB⁺⁺ auf 10 ml aufgefüllt, was einer Verdünnung von 1:50 entspricht. Die Verdünnungen 1:100 - 1:300 werden nach folgendem Verdünnungsschema hergestellt.

Endverdünnung	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
Serumverdünnung 1:50 (ml)	1	1	1	1	1
GVB ⁺⁺ (ml)	1	2	3	4	5

Alle im folgenden hergestellten Reaktionsmischungen werden zur Ermittlung von Doppelwerten zweifach angesetzt und im Eisbad bei 0-4°C gekühlt. 1 ml einer Serumverdünnung wird jeweils mit 1 ml GVB⁺⁺ und 0,5 ml der standardisierten Erythrozytenlösung EA gemischt und unter ständigem Schütteln 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 5 ml physiologische Kochsalzlösung hinzugefügt und 10 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Als Leerkontrolle K1 wird 0,5 ml EA mit 2 ml GVB⁺⁺ gelöst, 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 7,5 ml aufgefüllt. K1 gibt die nicht beeinflussbare Spontanhämolysen an und muß vom jeweilig gemessenen Extinktionswert subtrahiert werden. Die 100 % Kontrolle K2 stellt man durch

Lysieren von 0,5 ml EA mit 7 ml aqua dest. her. Die Kontrollen werden ebenfalls 10 Minuten lang bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Die oben beschriebenen Versuchsschritte sind in Abb. 5 tabellarisch zusammengefaßt. Der nach der Zentrifugation der Reaktionsmischungen verbleibende Überstand wird in Quarzküvetten gefüllt und spektrophotometrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 414 nm gemessen.

Versuchsansatz	Kontrolle 1	Kontrolle 2
0,5 ml EA (1×10^8 Zellen/ml in GVB ⁺⁺) + 1,0 ml Serumverdünnung (1:100-1:300) + 1,0 GVB ⁺⁺	0,5ml EA + 2,0ml GVB ⁺⁺	0,5ml EA + 7,0ml H ₂ O
Schüttelinkubator bei 37°C für 60 min. +		
5,0 ml NaCl (0,9%ig)	5,0ml NaCl (0,9%ig)	
Zentrifugation für 10 min. bei 2500 U/min. photometrische Messung der Extinktion bei 414 nm		

Abb. 5: Versuchsansatz und Kontrollen zur hämolytischen Komplementtitration.

f) Auswertung der Meßergebnisse, dargestellt an einem Beispiel

Als Beispiel dient das Serum des Patienten Nr. 4 M.B., das nach der unter 2.2. angegebenen Methode mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA bestrahlt wurde. Für die lichtgeschützte Kontrolle wurden am 26.5.82 folgende Extinktionswerte gemessen:

Serumverdünnung		1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	K1	K2
Extinktion bei 414 nm	A	0,540	0,420	0,254	0,104	0,060	0,008	0,580
	B	0,540	0,410	0,250	0,103	0,052	0,012	0,560

Der Mittelwert der Leerextinktion K1 beträgt 0,001. Er gibt die Spontanhämolysen an und wird von den gemessenen Extinktionswerten subtrahiert. Der Mittelwert der 100 % Kontrolle K2 beträgt 0,57. Die Hämolysen werden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hämolysen (\%)} = \frac{\text{gemessene Extinktion} - \text{Kontrolle 1}}{\text{Kontrolle 2}} \times 100 \%$$

Es ergeben sich folgende Hämolysenwerte:

Serumverdünnung		1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
Hämolysen (%) A		92,98	71,93	42,81	16,49	8,77
B		92,98	70,18	42,11	16,32	7,37

Auf Millimeterpapier werden die Serumverdünnungen auf der Abszisse und die zugehörigen Hämolysenwerte auf der Ordinate aufgetragen. Wenn man die Punkte miteinander verbindet, so erhält man eine sigmoidale Kurve (s. Abb. 6).

Es ist sinnvoll das Komplement im linearen Teil der Kurve zu titrieren. Dabei wird die Menge Komplement, die notwendig ist, eine 50 %ige Hämolysen unter Standardbedingungen zu verursachen, als Referenzpunkt (CH50) gewählt.

Die folgende Gleichung gibt das Verhältnis von % Hämolysen (y) und Komplementmenge (x) an:

$$y = \frac{x^n}{x^n + K^n}$$

Aus dieser Formel leitet sich die von Krogh'sche Gleichung ab:

$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$$

x = Komplementmenge y = Hämolysen (%)

n = Konstante, die die Neigung der Kurve bestimmt

K = Konstante, die die 50%-Einheit des Komplements wiedergibt

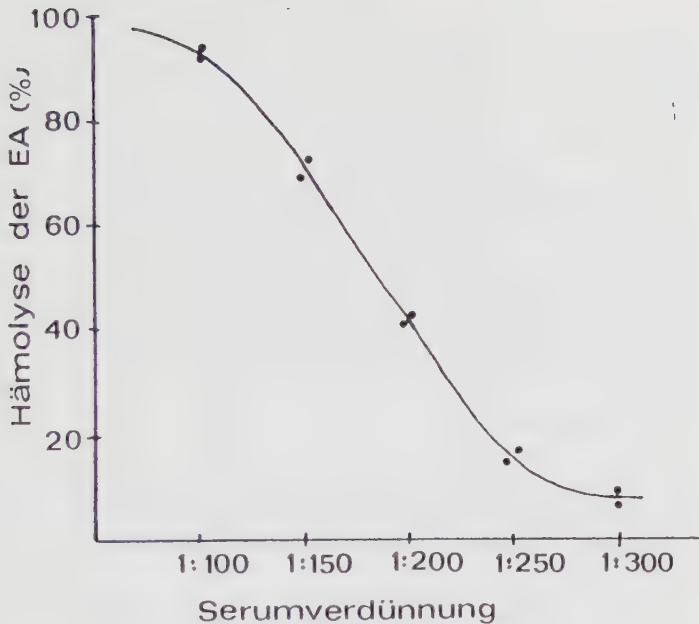


Abb. 6: Sigmoidale Dosis-Antwort-Kurve

Besteht eine 50%ige Lyse, so ist $y/1-y = 1$ und x wird gleich K . In unserem Beispiel erhält man folgende Werte für $y/1-y$:

Serumverdünnung		1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
y	A	13,24	2,26	0,748	0,198	0,096
1-y	B	13,24	2,35	0,727	0,195	0,080

Auf doppeltlogarithmischen Papier werden die Serumverdünnungen auf der Ordinate und die $y/1-y$ Werte auf der Abszisse eingetragen. Wenn man die Punkte miteinander verbindet erhält man eine Gerade mit der Gleichung:

$$\log x = \log K + 1/n \log (y/1-y)$$

Für $y/1-y = 1$, was einer 50 %igen Hämolyse entspricht, liest man den zugehörigen Werte für die Serumverdünnung auf der Ordinate ab (s. Abb. 8). In diesem Beispiel beträgt er 180, d.h. bei einer Serumverdünnung 1:180 werden 50 % standardisierten Menge von sensibilisierten Erythrozyten lysiert.

Abb. 7 zeigt das Originalversuchsprotokoll des Serums der Patientin Nr. 4 M.B., welches am 26.5.82 aufgenommen wurde. Die Buchstaben bedeuten:

A, A⁺: lichtgeschützte Kontrolle
B, B⁺: Patientenserum, mit 5 J/cm² UVA bestrahlt
C, C⁺: " " 10 " " "
D, D⁺: " " 50 " " "
E = Extinktion

Abb. 8 zeigt die Auftragung der $1/1-y$ Werte auf der Abszisse und der Serumverdünnungen auf der Ordinate auf doppeltlogarithmisches Papier. Es lassen sich folgende Serumverdünnungen ablesen:

Kontrolle: 1:180 5J/cm²: 1:155 10J/cm²: 1:145 50J/cm²: 1:110

Die Kurve zeigt, daß Serum D (bestrahlt mit 50 J/cm² UVA) bei einer Verdünnung von 1:110 den $y/1-y$ Wert von 1 (= 50 % Hämolyse) erreicht, die Kontrolle A (unbestrahlt) dagegen erst bei einer Verdünnung von 180. Serum D enthält also 110 CH50-, und das Kontrollserum 180 CH50-Einheiten.

V E R S U C H S P R O T O K O L L

Datum: 26.05.85

Serum: Nr. 4, E.B.

	Serum- probe	Serumverdünnung				
		1/100	1/150	1/200	1/250	1/300
Extinktion (OD 414)	A	0,540	0,420	0,254	0,104	0,060
	A [^]	0,540	0,410	0,250	0,104	0,052
	B	0,525	0,330	0,160	0,073	0,040
	B [^]	0,510	0,325	0,157	0,070	0,037
	C	0,500	0,285	0,122	0,060	0,035
	C [^]	0,480	0,290	0,108	0,062	0,030
	D	0,360	0,160	0,046	0,030	-
	D [^]	0,360	0,096	0,050	0,024	-
%-Hämolyse (-y)	A	92,98	71,93	42,81	16,49	8,77
	A [^]	92,98	70,18	42,11	16,32	7,37
	B	90,35	56,14	26,32	11,05	5,26
	B [^]	87,72	55,26	25,79	10,53	4,74
	C	85,96	48,25	19,65	8,77	4,39
	C [^]	82,46	49,12	17,19	9,12	3,51
	D	61,40	26,32	6,32	3,51	-
	D [^]	61,40	15,09	7,02	2,46	-
$\frac{y}{1-y}$	A	13,24	2,26	0,748	0,198	0,096
	A [^]	13,24	2,35	0,727	0,195	0,080
	B	9,36	1,28	0,358	0,135	0,056
	B [^]	7,15	1,23	0,347	0,117	0,050
	C	6,11	0,93	0,244	0,096	0,046
	C [^]	4,70	0,96	0,208	0,100	0,036
	D	1,59	0,35	0,067	0,036	-
	D [^]	1,59	0,178	0,076	0,025	-
Extinktion K1:	0,010	0,008	0,011		$\bar{x} = 0,010$	
" K2:	0,570	0,580	0,565		$\bar{x} = 0,570$	

Abb. 7: Versuchsprotokoll zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität in Serum Nr. 4 nach Bestrahlung mit 5 (B), 10 (C) und 50 (D) J/cm² UVA und im unbestrahlten Kontrollserum (A). K1 = Leerextinktion, K2 = 100% Hämolyse.

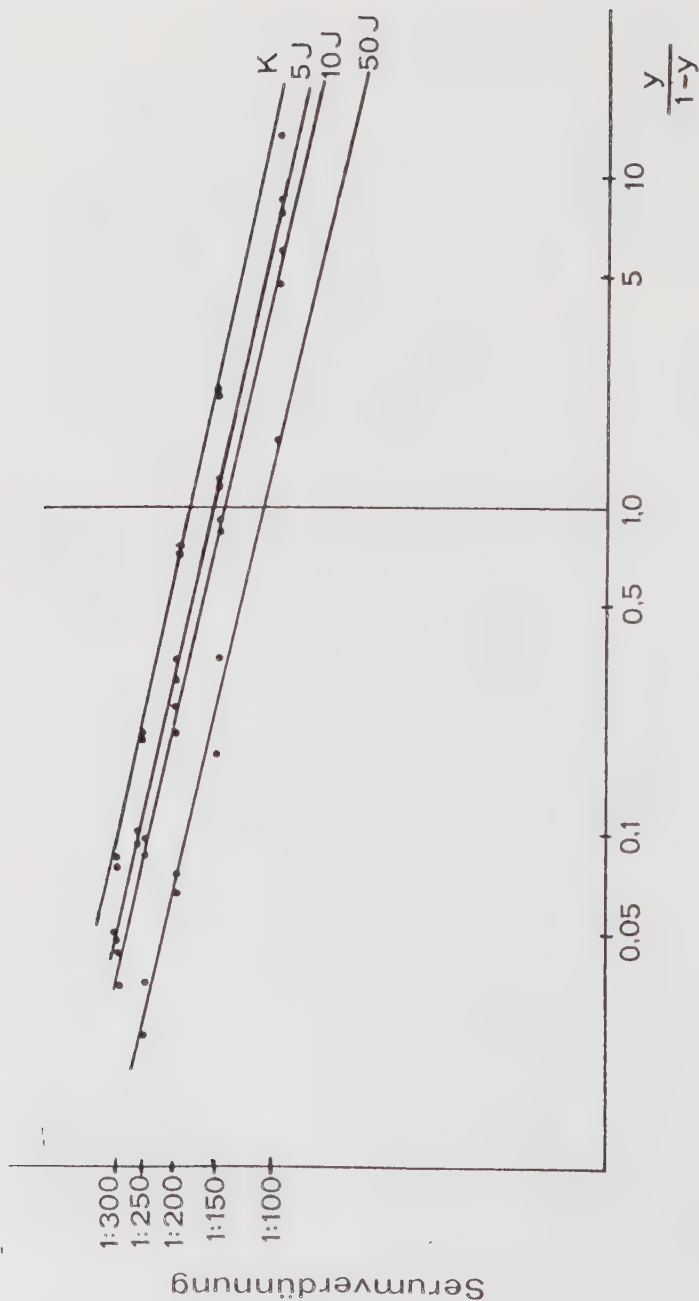


Abb. 8: Dosis Antwort-Kurve zur Bestimmung des hämolytischen Titters in mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA bestrahltem Serum der Patientin Nr. 4. K = Unbestrahlte Kontrolle.

Methode 2: Zweidimensionale, gekreuzte Immunelektrophorese (CIEP)

Prinzip:

Die nach Laurell modifizierte zweidimensionale Immunelektrophorese (61) wurde zum Nachweis der proteolytischen C3-Spaltung, die bei der Komplementaktivierung entsteht, verwendet. In der 1. Dimension der Elektrophorese wird das auf Agarplatten aufgetragene Serum durch Wanderung im elektrischen Feld nach Molekülgröße in Fraktionen aufgetrennt. Dabei wandert das C3-Spaltprodukt schneller als das ungespaltene C3-Nativmolekül. In der 2. Dimension durchläuft das Serum im 90° Winkel zur ersten Wanderungsrichtung ein Agarosegel, in dem ein spezifisches Antiserum gegen das Spaltprodukt C3c inkorporiert ist. Die dabei entstehenden Komplexe aus C3c und Anti-C3c-Antikörper bilden charakteristische Präzipitattlinien, die nach Trocknen und Pressen des Agars mit dem Farbstoff Coomassie-Blue sichtbar gemacht werden. Die quantitative Bestimmung der Verhältnisse von C3c-Spaltprodukten zu nativem C3 in den Seren vor und nach Bestrahlung erfolgt mit Hilfe einer neuentwickelten planimetrischen Methode.

Material:

- LKB 2103 Powersupply
- LKB 2117 Multiphor, Elektrophoresekammer
- LKB 2209 Multitemp, Kühlaggreat
- Planimetrieapparat: MOP-AMO 3, Kontron Meßgerät GmbH
- Oxford Sampler Micropipetting System 5 ul, Us Pat.Nr. RE 27637
- Filterwatte, extrafein, Hecht Nr. 1408/2
- Whatman Filterpapier 104 x 253 mm, Grade 1
- Agarose ME Seakam EEO- (m_r): 0,16-0,19; Lot.Nr. 60560
- Rabbit immunoglobulins to human C3c-Complement; DAKO immunoglobulins a/s Vertrieb durch Boehringer Ingelheim Diagnostika
- Titriplex III, Merck, Art.Nr. 8418 = EDTA
- 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz, Merck, Art.Nr. 6318
- 5,5 Diäthylbarbitursäure, Merck, Art.Nr. 276
- Coomassie Brilliant Blue, rein, C.T. 42660
- Rowi Diagläser 5 x 5, Rowi Int. 88550

Verwendete Puffer und Lösungen:

- EDTA-barbitalpuffer (4 x conc.) = Stammlösung
5,95 g EDTA
5,45 g 5,5 Diäthylbarbitursäure
37,92 g 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz
-

mit aqua dest. auf 2000 ml auffüllen

- EDTA-barbitalpuffer = Gebrauchslösung:
500 ml Stammlösung wird mit 1500 ml aqua dest. gemischt und der pH-Wert auf 8,6 eingestellt.
- Herstellung einer Hämoglobinlösung als Markersubstanz für die Elektrophorese:
Hammelblut wird 3x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit aqua dest. auf das ursprüngliche Volumen resuspendiert. Die so hämolytisch gewordene Lösung wird 20 Minuten bei 4000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und als Markersubstanz verwendet.
- Coomassie Blue Lösung:
Es wird eine Lösung aus 5 Teilen Methanol, 5 Teilen aqua dest. und 1 Teil konzentrierter Essigsäure hergestellt. In 500 ml dieser Flüssigkeit werden 250 mg Coomassie Blue gelöst, was einer 0,05%igen Lösung entspricht.
- Entfärbelösung: Wie oben, aber ohne Farbstoff
- Agaroselösung 1 %ig:
1 g Agarose wird zu 100 ml EDTA-barbitalpuffer gegeben und vorsichtig in einem heißen Wasserbad erhitzt. Wenn sich die Agarose vollkommen gelöst hat, läßt man die heiße Flüssigkeit durch eine mit Filterwatte gefüllte 20 ml Spritze laufen. Die so gereinigte Agarose kann entweder sofort verwendet oder bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Herstellen von Gelplatten:
Als Grundlage für die Gelplatten werden 5 x 5 cm große Diaglaser verwendet. Diese müssen vor Gebrauch in einer Lösung von Aceton und Äthanol mehrere Tage sorgfältig gereinigt und entfettet werden. Bevor die Diaglaser mit Agarose beschichtet werden, bringt man einen feinen Gel-

film auf, was eine bessere Haftung des Agars auf dem Glas gewährleistet. Man gibt einen Tropfen der heißen 1%igen AgaroseLösung auf das Glas und streicht diesen in der Art eines Blutaustreiches zu einer dünnen Schicht aus. Wenn diese fest angetrocknet ist, wird vorsichtig 3,3 ml AgaroseLösung auf das vorbereichichte Diaglas gegossen. Das Beschichten der Glasplatten muß unbedingt auf vollkommen waagrechter Unterlage erfolgen. Wenn der Agar sich verfestigt hat, werden zwei Einfülllöcher in das Gel gestanzt. Man bedient sich dazu einer Hautstanze von 3 mm Durchmesser und setzt die Löcher in jeweils 4 mm Abstand zu beiden Außenkanten der Gelplatte (s. Abb. 9).



Abb. 9: Lage der Einfülllöcher auf den Gelplatten

Die fertigen Gelplatten werden in mit EDTA-barbitalpuffer angefeuchteten Kammern bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Durchführung:

a) 1. Dimension:

Die beiden Kammern des Multiphor Elektrophoresengerätes werden mit jeweils 1 l EDTA-barbitalpuffer gefüllt. Pro Multiphor werden 4 Agarplatten in gleicher Höhe und in gleichem Abstand auf die Kühlplatten der Kammer gelegt. Die beiden Stanzlöcher zeigen zur kathodalen Seite. Mit Hilfe des Multitemp werden die Agarplatten während des gesamten Versuches auf eine Temperatur von 8°C gekühlt. Als Brücken zwischen Gel und Puffer dienen saugfähige Kunstledertücher. Mit dem Oxford Sampler Mikropipettiersystem werden jeweils 5 µl Hämoglobinmarker in das - von der Kathodenseite aus gesehen

- rechte Loch der Agarplatten und jeweils 5 μ l des zu untersuchenden Serums in das linke Loch pipettiert (s. Abb. 10).

Mit dem Powersupply wird eine Spannung von 200 Volt angelegt, wobei ein Strom von 35 milliampere fließen sollte. Das Serum wandert in diesem Feld von der Kathodenseite zur Anode, was durch den Hämoglobinmarker sichtbar gemacht wird (s. Abb. 10).

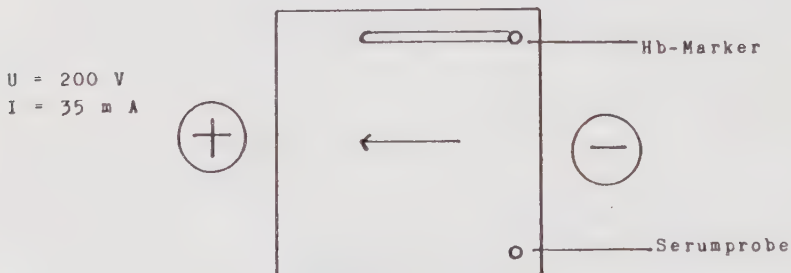


Abb. 10: Elektrophoretische Auftrennung der Serumbestandteile (1. Dimension).

Nach 2-2 1/2 Stunden Laufzeit hat der Hämoglobinmarker die Mitte der Agarplatten erreicht. Man unterbricht den Stromkreis und nimmt die Agarplatten aus der Kammer. Bevor man mit der 2. Dimension beginnt, muß der Puffer aus beiden Kammern zum Ionenausgleich gemischt werden.

2. Dimension:

Nach Beendigung der 1. Dimension werden die Gelplatten so präpariert, daß nur ein 1 cm breiter Gelstreifen, der die elektrophoretisch aufgetrennten Serumbestandteile enthält, belassen wird. Die übrige Agarfläche wird mit einem Skalpell abgetrennt und vorsichtig entfernt (s. Abb. 11).

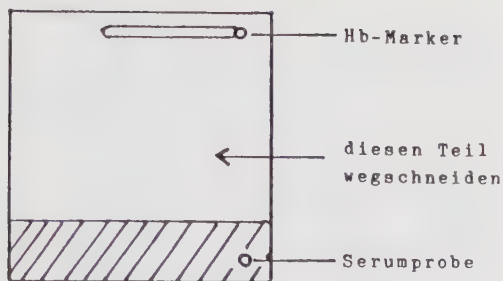


Abb. 11: Präparieren der Gelplatten für die 2. Dimension

Man erwärmt 1%ige Agaroselösung vorsichtig im Wasserbad auf maximal 56°C., weil bei höheren Temperaturen das zuzusetzende Immunglobulin denaturiert wird. 2,65 ml der Agaroselösung werden in ein Reagenzglas pipettiert und mit 20 μ l Kaninchen Anti C3c Immunglobulin sorgfältig vermischt. Anschließend wird der freie Teil der Agarplatten mit dieser Lösung ausgegossen, wobei man wieder darauf achten sollte, daß die Diagonalen vollkommen waagrecht liegen und kein Agar auf den noch verbliebenen 1 cm breiten Gelstreifen fließt.

Vier auf diese Weise behandelte Agarplatten werden so in die Elektrophoresekammer gelegt, daß der das Testserum enthaltene Gelstreifen der Kathode anliegt (s. Abb. 12). Es wird eine Spannung von 50 Volt angelegt, wobei ein Strom von 8 milliampere fließen sollte. Das vorher in Fraktionen aufgetrennte Serum wandert nun in das Immunglobulinhaltige Gel (s. Abb. 12). Die Laufzeit der 2. Dimension beträgt ca. 12-16 Stunden.



Abb. 12: Immundiffusion der aufgetrennten Serumbestandteile in ein Anti-C3c-haltiges Gel (2. Dimension)

c) Pressen, Trocknen und Färben der Gelplatten

Nach Ablauf der 2. Dimension werden die Gelplatten für 30 Minuten in 0,9 %ige Kochsalzlösung und 15 Minuten in aqua dest. gespült. Bei diesem Vorgang werden nicht präzipitierte Eiweißanteile aus dem Gel entfernt. Anschließend werden die Agarplatten auf eine ebene Unterlage gelegt, mit angefeuchtetem Whatman Filterpapier und 8-10 Lagen von gefalteten Papiertüchern bedeckt und durch Auflage einer nicht zu schweren Metallplatte gepreßt. Nach 15 Minuten entfernt man Gewicht, Papiertücher und Filterpapier, wobei man darauf achten muß, daß sich das Agarosegel nicht von dem Diaglas löst. Der ganze Wässerungs- und Pressvorgang wird noch einmal wiederholt. Anschließend werden die feuchten Agarplatten im Luftstrom eines Ventilators getrocknet. Das Gel verwandelt sich dabei in einen ganz feinen, durchsichtigen Film, der fest auf dem Diaglas haftet.

Die getrockneten Agarplatten werden 10 Minuten lang in Coomassie Blue-Lösung getaucht. Die präzipitierten Eiweißkomplexe färben sich dabei intensiv blau an. Der nicht protein-gebundene Farbstoff wird durch 10-minütiges Eintauchen in Entfärbelösung entfernt. Die Glasplatten werden an der Luft getrocknet, mit Diaußenmasken gerahmt und beschriftet.

d) Auswertung der Meßergebnisse

Um die unterschiedliche Position der Präzipitationsgipfel für gespaltenes und natives C3 auf den Gelplatten zu demonstrieren, werden zwei Vorversuche durchgeführt.

1) Vorversuch mit Zymosan vorbehandeltem Normalserum

Zymosan, ein Polysaccharid führt zur Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems und zur vollständigen proteolytischen Spaltung von C3 (31, 63, 93). 10 mg Zymosan (von *Saccharomyces cerevisiae* der Firma Sigma Chemical Company, Best. Nr. Z 4250) wird mit 1 ml Serum für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Serum für 10 Minuten bei 2500 U/min zur Entfernung der Bierhefepartikel zentrifugiert. Das Auftreten von C3 Spaltprodukten wird mit der CIEP bestimmt.

2) Vorversuch mit frischem Normalserum

In frischem unbehandeltem Normalserum eines gesunden Probanden wird das Vorkommen von C3-Spaltprodukten mit Hilfe der CIEP bestimmt. Abb. 13 zeigt das Ergebnis beider Vorversuche.

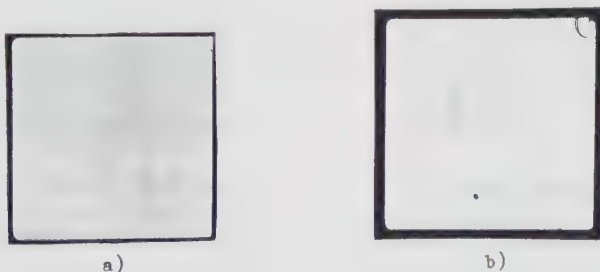


Abb. 13: CIEP mit Anti C3c-Serum von
a) unbehandeltem Normalserum
b) mit Zymosan behandeltem Normalserum

Wie Abb. 13a) zeigt, bildet sich in der CIEP mit frischem Normalserum nur ein Präzipitationsgipfel, der relativ weit kathodenwärts liegt. Er repräsentiert das native, ungespaltene C3, was infolge seines relativ hohen Molekulargewichtes nicht so weit im elektrischen Feld wandert. Abb. 13b zeigt, daß sich in dem mit Zymosan vorbehandeltem Serum ein Präzipitationsgipfel bildet, der viel weiter anodenwärts liegt. Die C3-Spaltprodukte, die in diesem Serum entstehen, sind leichter als natives C3 und wandern daher in der 1. Dimension der CIEP weiter zur Anode.

Bei den meisten der bestrahlten Patientenserum findet man jedoch sowohl gespaltenes als auch ungespaltenes C3. Dies zeigt sich in der Immunelektrophorese in einer zweigipfiligen Kurve. Die quantitative Auswertung dieser Kurven wird im folgenden anhand eines Beispiels erklärt.

Abb. 14 zeigt das Ergebnis der CIEP mit Serum der Patientin Nr. 12 E.B. nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA. Bei der Kontrolle K1 handelt es sich um die lichtgeschützte Kontrolle.

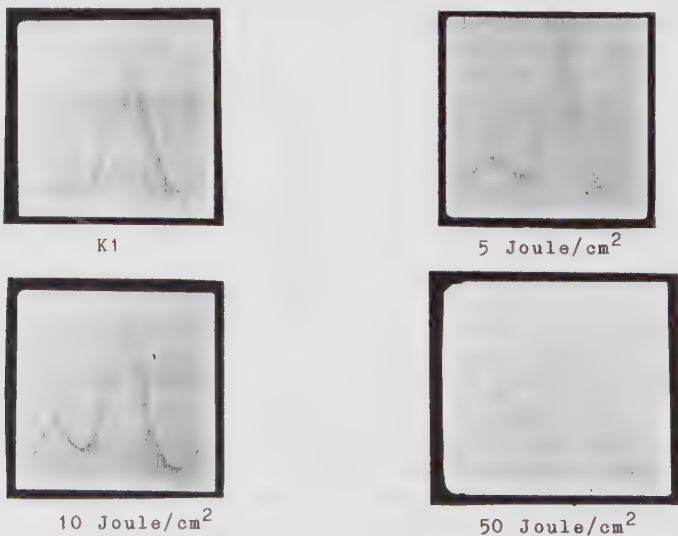


Abb. 14: CIEP der Patientin Nr. 12 E.B.

Die Präzipitatlinien auf den Agarplatten werden durch Photokopie auf Papier übertragen. Durch den tiefsten Punkt der Kurve zwischen den beiden Gipfeln wird eine Trennlinie gezogen (s. Abb. 15). Durch Umfahren mit dem Lichtzeiger des Planimetrieegerätes MOP-AMO 3 wird der Inhalt der schraffierten Fläche und der Gesamtfläche bestimmt (Abb. 15).

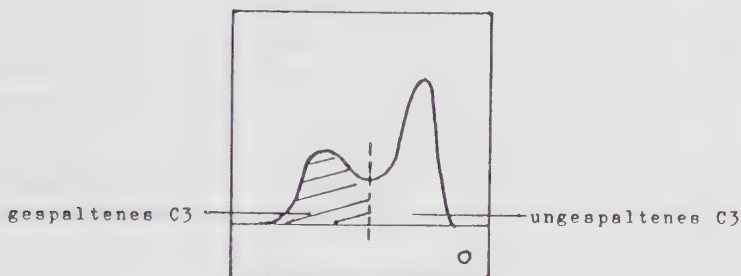


Abb. 15: Quantitative Bestimmung der C3-Spaltung.

Dieser beträgt in unserem Beispiel 94 mm^2 für die anodale, das C3-Spaltprodukt repräsentierende Fläche und 316 mm^2 für die Gesamtfläche (s. Tab. 2). Als Maß für die C3-Spaltung wird der prozentuale Anteil der anodalen Fläche an der Gesamtfläche definiert, und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{C3-Spaltung (\%)} = \frac{\text{anodale Fläche}}{\text{Gesamtfläche}} \times 100 \%$$

Er beträgt in unserem Beispiel $29,7 \%$ (s. Tab. 2).

Tab. 2: Berechnung der C3-Spaltung im Serum der Patientin Nr. 4 nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA

Serum	Bestrahlung	anodale Fläche (mm^2)	Gesamtfläche (mm^2)	C3-Spaltung (%)
Nr 12	lichtgeschützt	-	242	-
Nr 12	5 J/cm^2 UVA	35	257	13,6
Nr 12	10 J/cm^2 UVA	49	266	18,4
Nr 12	50 J/cm^2 UVA	94	316	29,7

Methode 3: Radiale Immundiffusion

Prinzip:

Die einfache Immun-Diffusionsmethode nach Mancini (72) dient zur quantitativen Bestimmung eines speziellen Proteins im Serum. Eine unbekannte Menge Antigen, in diesem Fall C3 und C4, diffundiert radial vom Auftragungsort in das umgebende Gel, welches einen spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Antigen in homologer Verteilung enthält. Dabei bilden sich ringförmige Immunpräzipitate, deren Fläche direkt proportional zur Antigenkonzentration und umgekehrt proportional zur Antikörperkonzentration ist. Bei bekannter Antikörperkonzentration kann man mit Hilfe von Standardlösungen den Antigengehalt einer Serumprobe bestimmen.

Material:

- M-Partigen Immundiffusionsplatte C3c (beta 1 A Globulin)
- M-Partigen Immundiffusionsplatte C4 (beta 1 E Globulin)
- Protein-Standard Serum B (3 Lösungen)
- Standard-Human-Serum, stabilisiert (3 Lösungen)
- Partigen-Dispenser und Kapillaren
- Partigen Meßlineal
- Meßlupe

Alle Materialien sind Produkte der Firma Behringwerke AG.

Durchführung:

Je 5 μ l der Protein-Standard Lösung I, II und III werden in die Auftragsstellen 1-3 der Immundiffusionsplatten eingefüllt. Zur Bestimmung von C3 verwendet man die C3c Immundiffusionsplatten mit dem Protein-Standard Serum B und für C4 die C4-Platten mit stabilisiertem Standard Humanserum. Probandenserum wird mit gleicher Menge physiologischer NaCl-Lösung 1:1 verdünnt und jeweils 0,5 μ l in die restlichen Auftragsstellen 4-12 eingefüllt. Die Immundiffusionsplatte wird verschlossen und auf eine waagrechte Unterlage gestellt.

Nach ca. 50 Stunden bei Raumtemperatur ist der Diffusionsvorgang beendet.

Auswertung:

Der Durchmesser D der Präzipitalringe wird mit Meßlineal und Meßlupe auf 0,1 mm genau abgelesen. Die quadrierten Durchmesser D^2 der Standardpräzipitate werden auf linearem Millimeterpapier als Funktion der bekannten Konzentration der Standardlösungen I, II und III aufgetragen. Es resultiert eine Gerade, die als Bezugskurve dient, und an der man die Konzentrationen der Probandensera unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors abliest. Man sucht sich dazu den gemessenen Durchmesser zum Quadrat auf der Ordinate, geht waagrecht bis zur Bezugskurve und von dort senkrecht bis zur Abszisse und liest die entsprechende Konzentration ab. In diesem Fall muß man die in der Kurve abgelesenen Konzentrationen verdoppeln um den korrekten Wert zu erhalten, da das Serum vor Versuchsbeginn 1:1 verdünnt wurde.

2.2. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen

Material:

- Protoporphyrin IX
- Titriplex III (EDTA); Merck Art. Nr. 8418
- Äthylenglykol bis (2 aminoäthyläther) N, N-tetraessigsäure (EGTA) Serva, Heidelberg
- $MgCl_2$
- Na_2HPO_4
- $H_2PO_4 \times 2H_2O$
- Carotaben (beta-Caroten), Hermal Chemie, IKS Nr. 41882

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 0,2 M EGTA Lösung:
3,8 g EGTA werden in 40 ml aqua dest. und 5 ml 0,5 M NaOH bei schwacher Hitze gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 mit HCl wird mit aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Man erhält eine 0,2 M EGTA-Lösung.
 - 0,1 M MgCl_2 -Lösung
 - EGTA/ Mg^{2+} -Gebrauchslösung:
Man gibt einen Teil der 0,2 M EGTA-Lösung und einen Teil der 0,1 M MgCl_2 -Lösung zusammen und erhält die EGTA/ Mg^{2+} -Gebrauchslösung mit 100 mM EGTA und 50 mM Mg^{2+} .
 - 0,3 M EDTA-Lösung:
11,27 g werden in 100 ml H_2O gelöst.
 - PBS-Puffer (0,01 M) nach Nairn:
1,07 g Na_2HPO_4
0,39 g $\text{H}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
8,5 g NaCl
-
- auf 1000 ml aqua dest. auffüllen und den pH-Wert auf 7,1 einstellen.
- Protoporphyrin IX-Stammlösung:
1 mg Protoporphyrin IX wird in 10 ml PBS-Puffer gelöst. Man erhält eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 μg Protoporphyrin pro ml.
 - beta-Carotin-Stammlösung:
Der Inhalt einer Kapsel Carotaben^R (25 mg) wird in 25 ml PBS-Puffer gelöst. Man erhält eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg beta-Carotin pro ml.

Durchführung:

2.2.1 Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin (PP)

Da Protoporphyrin sehr lichtempfindlich ist, werden alle Arbeiten mit diesem unter Rotlicht ausgeführt. Aus der Protoporphyrin-Stammlösung wird eine Reihenverdünnung (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) mit PBS-Puffer hergestellt. Zu jeweils 0,9 ml Normalserum werden 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe zugegeben. Es ergeben sich somit folgende Endkonzentrationen von PP im Serum: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 und 0,31 $\mu\text{g/ml}$ PP. Das Bestrahlen der Seren mit 50 J/cm^2 UVA geschieht nach der unter 2.1.3. beschriebenen Methode. Als Kontrollen dienen:

- 1) 1 ml Normalserum mit 10 μg PP, das während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA lichtgeschützt war.
- 2) 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml PBS-Puffer ohne PP, das mit 50 J/cm^2 bestrahlt wurde.
- 3) 1 ml unbestrahltes Normalserum ohne PP.

Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität und C3-Spaltung werden in diesen Proben mit den unter 2.1.4. beschriebenen Methoden bestimmt.

2.2.2. Untersuchung im Normalserum nach Zusatz von vorbestrahltem Protoporphyrin

1 ml der PP-Stammlösung (100 $\mu\text{g/ml}$) wird mit 100 J/cm^2 UVA bestrahlt. Zu jeweils 0,9 ml Normalserum gibt man 0,1 ml vorbestrahlte PP-Stammlösung oder 0,1 ml der unbehandelten Stammlösung. Beide Proben werden mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt. Als Kontrolle dienen:

- K1: 1 ml Normalserum, welches mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt wurde
- K2: 0,9 ml Normalserum + 0,1 ml vorbestrahlte PP-Stammlösung
- K3: 0,9 ml Normalserum + 0,1 ml unbestrahlter PP-Stammlösung

Die Kontrollen K3 und K2 wurden während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA vor Licht geschützt.

Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität und C3-Spaltung in den bestrahlten bzw. lichtgeschützten Proben werden mit den unter 2.1.4. beschriebenen Methoden bestimmt.

2.2.3. Einfluß des Chelatbildners EDTA auf die phototoxische Komplementaktivierung

Durch Zusatz von 0,4 ml PP-Stammlösung (100 ug/ml) zu 3,6 ml Normalserum erhält man ein Serum mit einer Konzentration von 10 ug PP/ml . Zu 0,9 ml dieses Serums werden 0,1 ml der 0,3 M EDTA-Lösung (Endkonzentration 30 mM) gegeben, und mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt. Als Kontrollen dienen:

K1: 0,9 ml Normalserum + 0,1 ml EDTA

K2: 0,9 ml PP-Serum (10 ug PP/ml) + 0,1 ml EDTA

Die K1-Kontrolle wird mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt. Die K2-Kontrolle wird während der Bestrahlung vor Licht geschützt. In sämtlichen Seren wird das Ausmaß der C3-Spaltung mit Hilfe der CIEP (s. 2.1.4.) gemessen.

2.3. Einfluß therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung

2.3.1. Untersuchung in Normalserum nach Zusatz von PP und beta-Carotin

Zu 3,6 ml Normalserum wurde 40 mg PP in 0,4 ml PBS-Puffer gegeben (Endkonzentration: 10 ug/ml). Zu jeweils 1 ml dieses Serums werden 10 ul bzw. 20 ul beta-Carotin-Stammlösung ($1 \text{ mg beta-Carotin/ml}$) gegeben, sodaß sich Endkonzentrationen von 10 bzw. $20 \text{ ug beta-Carotin/ml Serum}$ ergeben. Diese beiden Proben werden mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt und das Ausmaß der C3-Spaltung mit PP-haltigem, bestrahltem Serum, das kein beta-Carotin enthält, verglichen. Als Kontrollen dienen:

K1: 1 ml Normalserum + 20 μ l beta-Carotin-Stammlösung (1 mg beta-Carotin/ml)

K2: 1 ml Serum mit PP (10 μ g PP/ml) ohne beta-Carotin.

K1 wurde mit 50 J/cm² UVA bestrahlt, K2 dagegen vor Licht geschützt.

2.3.2. Versuche zur Therapie mit beta-Carotin

Ein freiwilliger Proband erhielt beta-Carotin in einer Dosierung von 100 mg/Tag über einen Zeitraum von 6 Wochen. Vor und nach Behandlung wurde Blut entnommen und der beta-Carotinspiegel im Serum bestimmt. Vor Therapiebeginn betrug der Wert 0,285 μ g beta-Carotin/ml, nach 6 Wochen 3,635 μ g/ml. Zu jeweils 0,9 ml von Serum vor und nach Behandlung werden 10 μ g PP in 0,1 ml Puffer gegeben (Endkonzentration 10 μ g PP/ml) und die Proben mit 50 J/cm² UVA bestrahlt. Als Kontrollen dienen:

K1: Probandenserum ohne Zusatz von PP, das mit 50 J/cm² UVA bestrahlt wurde.

K2: 0,9 ml Probandenserum + 0,1 ml PP-Stammlösung.

K2 wurde während der Bestrahlung vor Licht geschützt. In allen Serumproben wurde mittels der CIEP das Ausmaß der C3-Spaltung bestimmt.

Das Ausmaß der phototoxischen Komplementaktivierung konnte bei der Patientin Nr. 12 E.B. in Serumproben untersucht werden, die sowohl vor als auch nach einer Therapie mit 150 mg beta-Carotin pro Tag gewonnen wurde. Der Carotinspiegel in diesen betrug vor Therapiebeginn weniger als 0,05 μ g/ml und nach sechswöchiger Therapie 6,330 μ g/ml. Das Ausmaß der C3-Spaltung wurde mittels der CIEP bestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1 UV-induzierte Komplementaktivierung in Seren von Patienten mit EPP und Seren von Normalpersonen

3.1.1. Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität

Die Seren der Patienten 1-12 und der 6 Normalpersonen wurden nach der in 2.1. beschriebenen Methode mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA bestrahlt. Die hämolytische Gesamtkomplementaktivität wurde durch quantitative molekulare Titration nach der unter 2.2. angegebenen Methode bestimmt.

Tabelle 3 zeigt die Abnahme der Gesamtkomplementaktivität in den Seren der 12 Patienten nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA. Tabelle 4 zeigt als Kontrolle die Komplementveränderungen nach Bestrahlung von 6 Normalseren.

Tabelle 3: Veränderung der hämolytischen Komplementaktivität und C3-Spaltung nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA in Seren von Patienten mit EPP

Nr.	PP	UVA-Dosis	CH50	ΔCH50	CH50%	C3-Spaltung	korrigiert
1	0,5	K1	170	-	-	1,6	-
		K2	170	-	-	2,1	-
		5J	160	10	5,9	7,8	5,7
		10J	155	15	8,8	7,9	5,8
		50J	145	25	14,7	10,3	8,2
2	9,3	K1	170	-	-	2,8	-
		K2	170	-	-	2,2	-
		5J	150	20	11,8	17,4	15,2
		10J	145	25	14,7	19,5	17,3
		50J	110	60	35,3	29,2	27,0

Nr.	PP	UVA-Dosis	CH50	Δ CH50	CH50%	C3-Spaltung	korrigiert
3	3,6	K1	175	-	-	0	-
		K2	175	-	-	0	-
		5J	160	15	8,6	3,4	3,4
		10J	145	30	17,1	6,0	6,0
		50J	130	45	25,7	10,0	10,0
4	4,3	K1	180	-	-	0	-
		K2	180	-	-	0	-
		5J	155	25	13,9	8,1	8,1
		10J	145	35	19,4	10,2	10,2
		50J	110	70	38,9	18,2	18,2
5	0,6	K1	210	-	-	0	-
		K2	195	-	-	0	-
		5J	195	0	0	0	0
		10J	180	15	7,7	2,2	2,2
		50J	170	25	12,8	5,1	5,1
6	0,5	K1	170	-	-	0,6	-
		K2	150	-	-	1,7	-
		5J	140	10	6,7	4,8	3,1
		10J	125	25	16,7	4,6	2,9
		50J	105	45	30,0	9,3	7,6
7	16,0	K1	190	-	-	4,8	-
		K2	175	-	-	6,6	-
		5J	155	20	11,4	20,3	13,7
		10J	145	30	17,1	19,7	13,1
		50J	115	60	34,3	22,1	15,5
8	4,0	K1	220	-	-	3,9	-
		K2	190	-	-	5,7	-
		5J	170	20	10,5	21,0	15,3
		10J	155	35	18,4	23,2	17,5
		50J	110	80	42,1	29,7	24,0
9	20,0	K1	230	-	-	1,3	-
		K2	215	-	-	2,9	-
		5J	200	15	7,0	11,6	8,7
		10J	180	35	16,3	16,9	14,0
		50J	135	80	37,2	24,7	21,8

Nr.	PP	UVA-Dosis	CH50	Δ CH50	CH50%	C3-Spaltung	korrigiert
10	9,7	K1	190	-	-	0	-
		K2	170	-	-	0	-
		5J	140	30	17,6	7,5	7,5
		10J	125	45	26,5	17,5	17,5
		50J	65	105	61,8	32,5	32,5
11	6,1	K1	-	-	-	0	-
		K2	200	-	-	0	-
		5J	185	15	7,5	6,2	6,2
		10J	150	50	25,0	15,5	15,5
		50J	115	85	42,5	23,7	23,7
12	10,7	K1	130	-	-	0	-
		K2	130	-	-	0	-
		5J	100	30	23,1	13,6	13,6
		10J	87	43	33,1	18,4	18,4
		50J	45	85	65,4	29,7	29,7

PP: Konzentration von Protoporphyrin im Serum ($\mu\text{g/dl}$)

CH50 = Hämolytische Einheiten

Δ CH50 = Errechnet sich aus der Differenz von dem CH50-Wert der lichtgeschützten Kontrolle (K2) und dem CH50-Wert nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA.

CH50%: Prozentuale Abnahme der hämolytischen Aktivität CH50 nach Bestrahlung (CH50-Wert in lichtgeschützter Kontrolle = 100 %)

C3-Spaltung: Anteil des gespaltenen C3 am Gesamt-C3-Komplement

C3-Spaltung, korrigiert: In wenigen Seren war bereits vor Behandlung bzw. in den lichtgeschützten Kontrollen ein geringgradiger Anteil von C3-Spaltprodukten vorhanden, der bei der Messung der C3-Spaltung nach Behandlung berücksichtigt wurde.

K1: unbehandeltes Serum

K2: während der Bestrahlung lichtgeschütztes Serum

Tabelle 4: Veränderung der hämolytischen Komplementaktivität und der C3-Spaltung im Normals Serum nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

Nr.	UVA-Dosis	CH50	CH50	CH50%	C3-Spaltung	korrigiert
1	K2	160	-	-	0	-
	5J	160	-	-	0	-
	10J	160	-	-	0	-
	50J	130	30	18,8	6,7	6,7
2	K2	175	-	-	0	-
	5J	175	-	-	0	-
	10J	165	10	5,7	0	-
	50J	155	20	11,4	3,8	3,8
3	K2	195	-	-	0	-
	5J	195	-	-	0	-
	10J	190	5	2,5	0	-
	50J	135	15	7,6	-	-
4	K2	150	-	-	0	-
	5J	150	-	-	0	-
	10J	150	-	-	0	-
	50J	135	15	10,0	5,9	5,9
5	K2	160	-	-	0	-
	5J	160	-	-	0	-
	10J	150	10	6,3	0	-
	50J	140	20	12,5	4,1	4,1
6	K2	195	-	-	0	-
	5J	195	-	-	0	-
	10J	185	10	5,1	0	-
	50J	175	20	10,3	7,9	7,9

In den unbestrahlten Patientenserum (K1) beträgt der CH50-Wert im Durchschnitt 186 Einheiten (130-210 CH50-Einheiten). In den Patientenserum dagegen, die während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 lichtgeschützt waren, liegt der durchschnittliche CH50-Wert mit 177 Einheiten geringfügig niedriger und damit im gleichen Bereich wie in 6 Kontrollserum von Normalpersonen (173 Einheiten). Dies zeigt, daß UVA-unabhängige Faktoren während des Versuchsganges (z.B. Wärmeaktivierung oder Kontaktaktivierung an Plastikwänden) keinen Einfluß auf die Gesamtaktivität im Serum haben. Tabelle 5 und Abbildung 16 zeigen, daß es in den bestrahlten Serum von EPP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollserum zu einer wesentlich höheren durchschnittlichen Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität kommt. Die Aktivitätsminderung (CH50%) nimmt in Abhängigkeit von der eingestrahlten UV-Dosis zu und beträgt nach 50 J/cm^2 UVA im Durchschnitt 37 %. Allerdings erzeugt dieselbe UVA-Dosis auch in den Kontrollserum eine durchschnittliche Abnahme der Komplementaktivität von 11 %.

Tabelle 5: Durchschnittliche Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität im Serum von 12 Patienten mit EPP und 6 Normalpersonen nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA

	PP	UVA-Dosis	CH50	ΔCH50	CH50%
EPP (n=12)	7,1 ±6,3	K2	177±22	-	-
		5J	159±27	18±10	10,3±6,0
		10J	145±25	32±11	8,4±7,1
		50J	113±33	64±25	36,7±15,8
NS (n=6)	0,5	K2	173±19	-	-
		5J	173±19	-	-
		10J	167±17	6±5	3,3±2,8
		50J	153±21	20±5	11,1±3,2

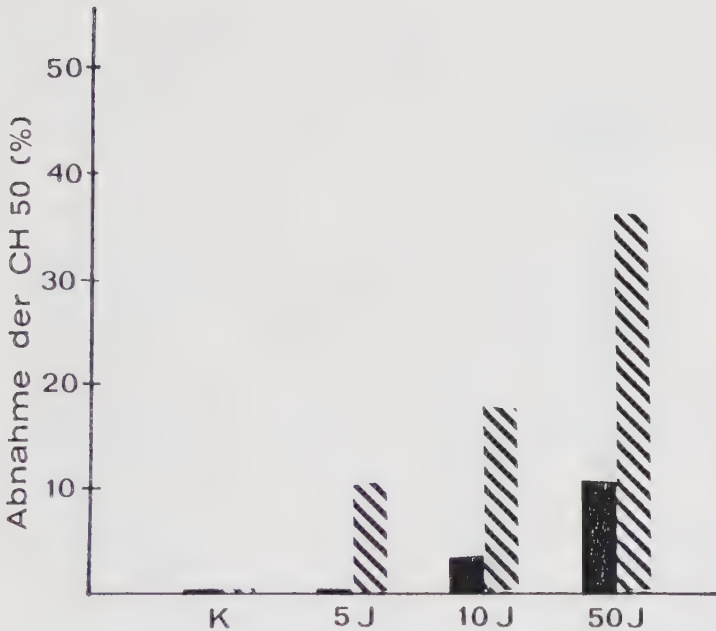


Abb. 16: Durchschnittliche Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität im Serum von Patienten mit EPP (▨) und Normalpersonen (■) nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

Die Patienten waren entsprechend ihrer Therapie in 3 Gruppen eingeteilt:

- A) 2 Patienten ohne Therapie
- B) 7 Patienten, die ausschließlich mit Carotinoiden behandelt wurden
- C) 3 Patienten, die Carotinoide und Chloroquin erhielten.

Tabelle 6 zeigt, daß die CH50-Abnahme bei den Patienten der Gruppe A (ohne Therapie) mit 64 % wesentlich ausgeprägter ist als bei den 7 Patienten der Gruppe B (Carotenoidtherapie) mit 37 %. Bermerkenenswert ist, daß Gruppe A mit 10,2 µg/dl nur einen geringfügigen höheren durchschnittlichen Porphyrinspiegel im Serum aufweist als Gruppe B.

Die 3 Patienten, die kombiniert mit Carotinoiden und Chlorquin behandelt wurden, zeigen mit 18 % den niedrigsten Aktivitätsverlust. Hier liegt allerdings auch die durchschnittliche Porphyrinkonzentration mit 1,5 ug/dl kaum über dem Normalwert und somit deutlich niedriger als in den ersten beiden Gruppen.

Tabelle 6: Durchschnittliche Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität in Seren von 3 Patientengruppen, die sich hinsichtlich der Therapie unterscheiden, nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

	PP	CH50	ΔCH50	CH50%
NS (n=6)	-	153±21	20±5	11,1±3,2
Gr. A (n=2)	10,2	55	95	63,3
Gr. B (n=7)	8,6	114	69	37,2
Gr. C (n=3)	1,5	148	32	17,7
gesamt (n=12)	7,1±6,3	113±33	63±25	36,7±15,8

Gr. A: Patienten ohne Therapie

Gr. B: Patienten, die ausschließlich Carotinoide erhielten

Gr. C: Patienten, die eine Kombination von Carotinoiden und Chloroquin erhielten.

3.1.2. Nachweis von C3-Spaltprodukten

Neben der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität wurde im Serum der Patienten 1-12 und der 6 Normalpersonen auch das Auftreten von C3-Spaltprodukten mit Hilfe der gekreuzten Immunelektrophorese nach der unter 2.3. angegebenen Methode bestimmt.

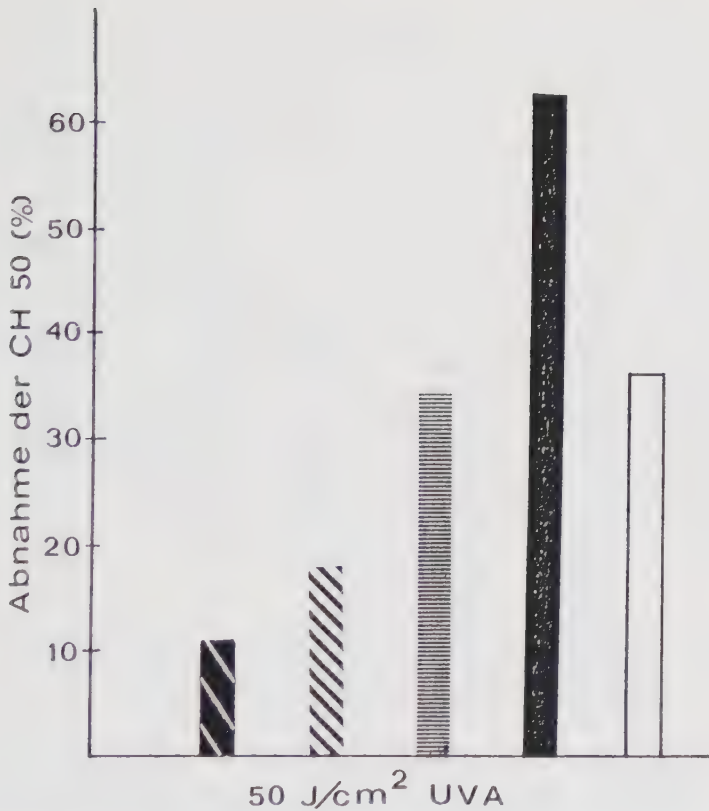


Abb. 17: Durchschnittliche Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität in Seren von Patienten ohne Therapie (■), mit Carotinoidtherapie (▨) und Kombinationstherapie mit Carotinoiden und Chloroquin (▧) im Vergleich zum Durchschnitt der EPP-Patienten und (□) zu Normalpersonen (▩) nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

In Tabelle 3 ist das Ausmaß der UV-induzierten C3-Spaltung in den Seren der 12 Patienten nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA aufgeführt. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis in den 6 Kontrollseren von Normalpersonen. In den unbestrahlten Patientenserum (K1) betrug der Anteil des gespaltenen C3-

Komplements am Gesamt-C3 durchschnittlich 1,25 % (0-4,8 %). In den Patientenseren, die während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA lichtgeschützt waren (K2), lag er mit 1,8 % (0-0,6 %) nur geringfügig höher. In den entsprechenden Kontrollen von 6 Normalpersonen konnte in keinem Fall eine C3-Spaltung nachgewiesen werden. Dies bestätigt das Ergebnis aus 3.1.1., wonach UVA-unabhängige Faktoren während des Bestrahlungsvorgangs keinen Einfluß auf die Komplementaktivierung haben.

Wie Tabelle 7 zeigt, ist die C3-Spaltung in den Seren von EPP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollseren wesentlich ausgeprägter. Ähnlich wie bei der CH50 nimmt der Anteil an gespaltenem C3-Komplement in Abhängigkeit von der eingestrahlten UV-Dosis zu und beträgt nach 50 J/cm² UVA im Durchschnitt 19 %. Dasselbe UVA-Dosis erzeugt in den Kontrollseren eine durchschnittliche C3-Spaltung von 5 % und liegt damit deutlich niedriger als in den Patientenseren (siehe dazu auch Abb. 18). Bei der Bestrahlung mit 5 und 10 J/cm² UVA konnte in den 6 Kontrollseren keine C3-Spaltung nachgewiesen werden.

Tab. 7: Durchschnittliche C3-Spaltung im Serum von 12 Patienten mit EPP und 6 Normalpersonen nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

	PP (ug/dl)	UVA-Dosis	C3-Spaltung	korrigiert
EPP (n=12)	7,1 ±6,3	K2	1,8±2,3	-
		5J	10,2±6,8	8,4±5,1
		10J	13,5±7,0	11,7±6,0
		50J	20,4±9,5	18,6±9,3
NS (n=6)	0,5	K2	0	-
		5J	0	-
		10J	0	-
		50J	4,7±2,8	4,7±2,8

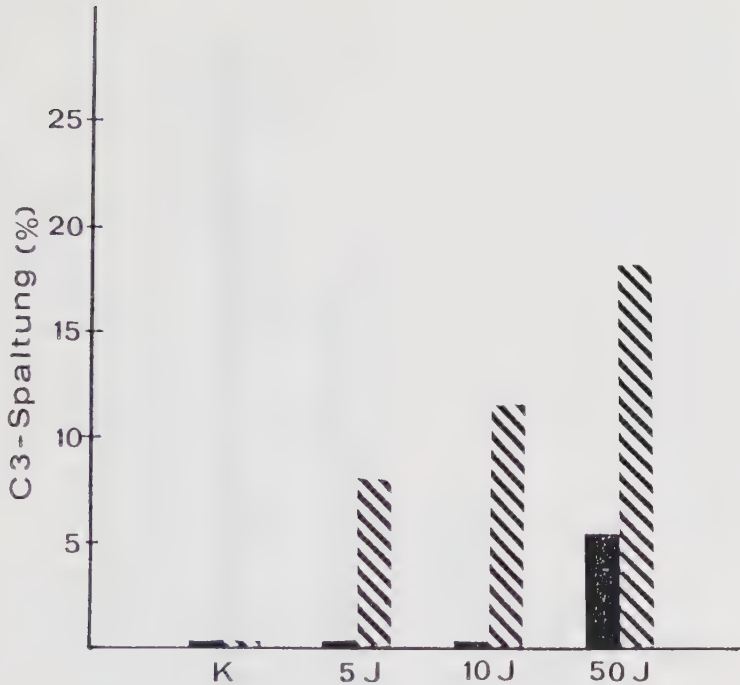


Abb. 18: Durchschnittliche C3-Spaltung im Serum von 12 Patienten mit EPP (▨) und 6 Normalpersonen (■) nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

Tabelle 8 und Abbildung 19 zeigen, daß ebenso wie der CH50-Abfall auch die C3-Spaltung bei den Patienten der Gruppe A (ohne Therapie) mit 31 % wesentlich stärker ist als in Gruppe B mit 20 % (Carotinoidtherapie). Auch in Gruppe C (Kombinationstherapie von Carotinoiden mit Chloroquin) ist der Anteil an C3-Spaltprodukten mit 8 % am geringsten.

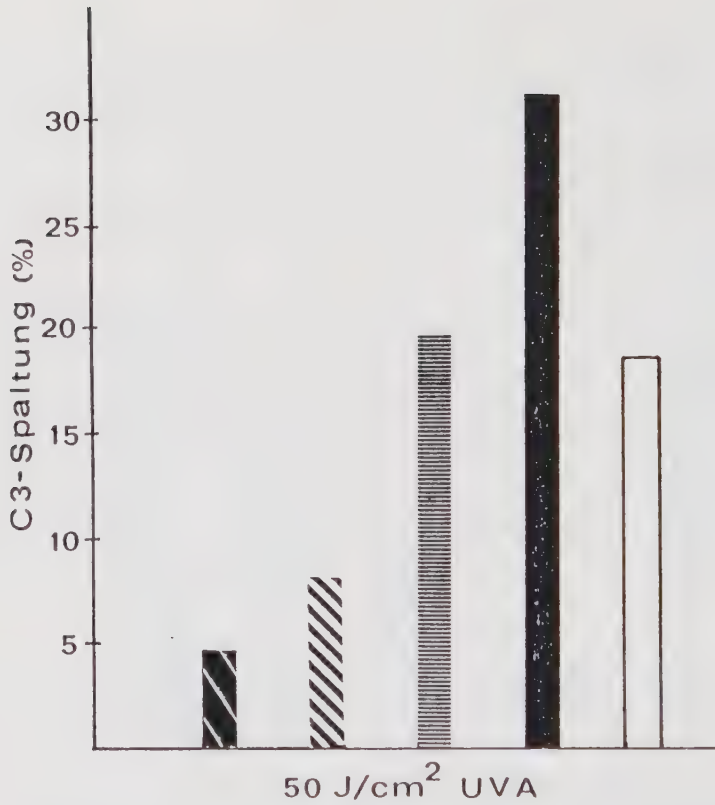


Abb. 19: Durchschnittliche C3-Spaltung in Seren von Patienten ohne Therapie (■), mit Carotinoidtherapie (▤) und Kombinationstherapie von Carotinoiden mit Chloroquin (▧) im Vergleich zum Durchschnitt der EPP-Patienten (■) und zu Normalpersonen (□) nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

Tab. 8: Durchschnittliche C3-Spaltung in Seren von 3 Patientengruppen, die sich hinsichtlich der Therapie unterscheiden, nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

	PP (ug/dl)	C3-Spaltung	korrigiert
NS (n=6)	0,5	4,7±2,8	4,7±2,8
Gr. A (n=2)	10,2	31,1	31,1
Gr. B (n=7)	8,6	22,4	19,7
Gr. C (n=3)	1,5	8,5	7,8
gesamt (n=12)	7,1±6,3	20,4±9,5	18,6±9,3

3.1.3. Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung von Komplementveränderungen

Tab. 9: Abfall der hämolytischen Aktivität und C3-Spaltung im Serum von 12 Patienten mit EPP nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

Nr.	5J		10J		50J		
	CH50	CIEP	CH50	CIEP	CH50	CIEP	
1	5,9	5,7	8,8	5,8	14,7	8,2	
2	11,8	15,2	14,7	17,3	35,3	27,0	
3	8,6	3,4	17,1	6,0	25,7	10,0	
4	13,9	8,1	19,4	10,2	38,9	18,2	
5	0	0	7,7	2,2	12,8	5,1	
6	6,7	3,1	16,7	2,9	30,0	7,6	
7	11,4	13,7	17,1	13,1	34,3	15,5	
8	10,5	15,3	18,4	17,5	42,1	24,0	
9	7,0	8,7	16,3	14,0	37,2	21,8	
10	17,6	7,5	26,5	17,5	61,8	32,5	
11	7,5	6,2	25,0	15,5	42,5	23,7	
12	23,1	13,6	33,1	18,4	65,4	29,7	Gesamtwerte
Σ	124,0	100,5	220,8	140,4	440,7	223,3	785,5 464,2
$\bar{x}; \bar{y}$	10,3	8,4	18,4	11,7	36,7	18,6	21,8 12,9
σ	± 6,0	± 5,1	± 7,1	± 6,0	± 15,8	± 9,3	± 15,2 ± 8,1
R	0,62		0,68		0,89		0,85
m	0,53		0,58		0,52		0,45
b	2,9		1,1		-0,7		3

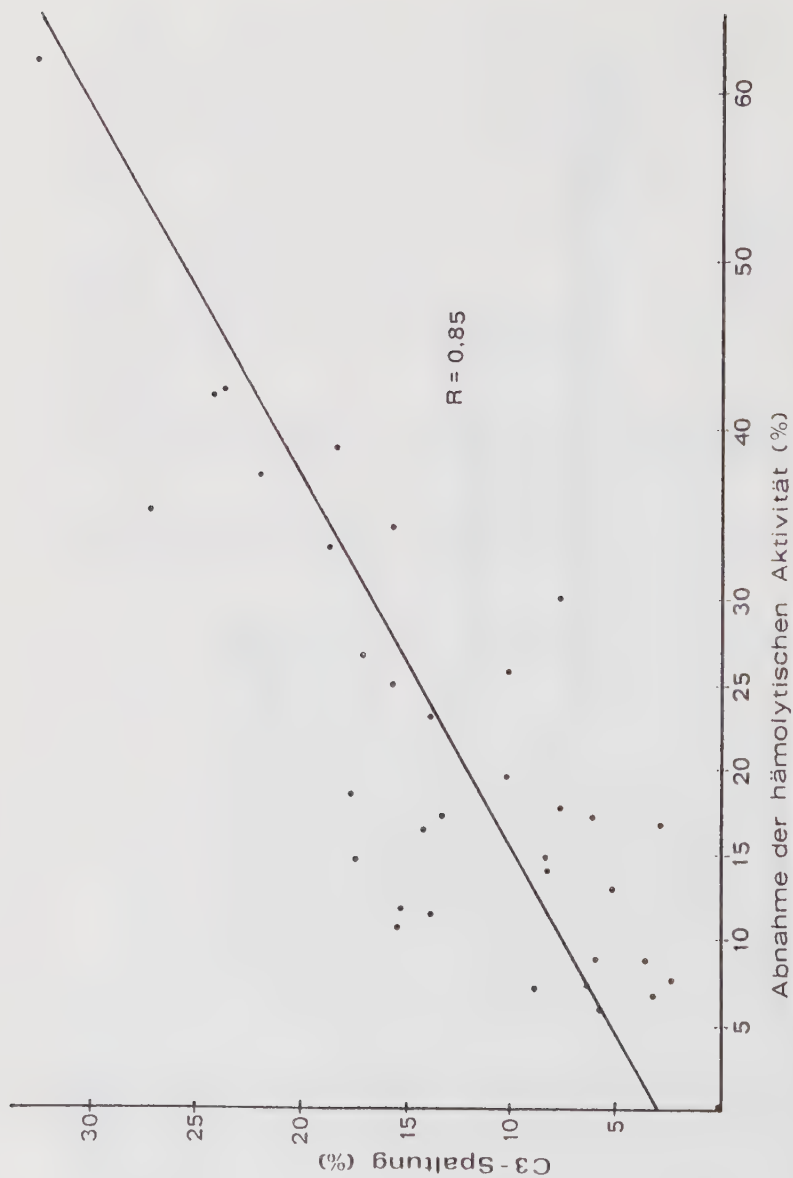


Abb. 20: Korrelation zwischen Abnahme der hämolytischen Aktivität und C3-Spaltung im Serum der Patienten nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

Beim Vergleich der Ergebnisse des hämolytischen Assays und der gekreuzten Immunelektrophorese fällt auf, daß ein hoher Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität stets mit einem vermehrten Auftreten von C3-Spaltprodukten verbunden ist. Es soll daher untersucht werden, ob eine lineare Korrelation zwischen beiden Methoden besteht. In Tabelle 9 sind sämtliche Meßgrößen der Patienten 1-12 zusammengetragen. Die Angabe des Abfalls der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität und des Anteils an C3-Spaltprodukten erfolgt in Prozent.

Die zusammengehörenden Wertepaare von CH50 und CIEP werden jeweils getrennt nach Bestrahlungsdosis von 5J, 10J und 50J UVA/cm² und einmal gemeinsam in ein Koordinatensystem eingetragen (siehe Abb. 20). Auf der x-Achse wird die Abnahme der hämolytischen Aktivität in Prozent, auf der y-Achse der Anteil des gespaltenen C3-Komplements ebenfalls in Prozent aufgetragen. Durch lineare Regression legt man eine Bestgerade durch die Punkte und berechnet den Korrelationskoeffizienten (R). Dabei kommen folgende Formeln zur Anwendung:

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}$$

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{N}$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}{N-1}}$$

$$R = \frac{m \cdot \sigma_x}{\sigma_y}$$

m = Steigung der Korrelationsgeraden

b = Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse

σ_x = Standardabweichung aller x mit dem Mittelwert $\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$

R = Korrelationskoeffizient

Es ergaben sich folgende Korrelationskoeffizienten (s. auch Tab. 9):

5J Bestrahlung:	0,62
10J Bestrahlung:	0,68
50J Bestrahlung:	0,89
alle Werte:	0,85

Legt man alle gemessenen Werte der Patienten 1-12 zugrunde, so ergibt sich eine Korrelation von 0,85 zwischen CH50 und CIEP.

3.1.4. Korrelation zwischen UV-induziertem Komplementverbrauch und Porphyrinspiegel im Serum der Patienten mit EPP

In der Auswertung der Meßergebnisse der Patientengruppen, die sich hinsichtlich ihres Porphyrinspiegels im Serum unterschieden, zeigte sich, daß es bei Patienten mit erhöhten Protoporphyrinkonzentrationen im Serum zu einer stärkeren Komplementaktivierung kam. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wird im folgenden untersucht, ob eine lineare Korrelation zwischen Serumporphyrinspiegel und Ausmaß der C3-Spaltung bzw. Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität besteht. In Tabelle 10 sind Protoporphyrinkonzentration im Serum (ug/dl), CH50 und C3-Spaltung (jeweils in Prozent) der Patienten 1-12 nach Bestrahlung mit 50 J UVA zusammengestellt.

Die Wertepaare PP zu CH50 und PP zu CIEP aus Tabelle 10 werden jeweils in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei die PP-Konzentration auf der x-Achse und der Anteil des gespaltenen C3 bzw. der Abfall der hämolytischen Aktivität auf der y-Achse aufgetragen wird. Nach der oben angegebenen Methode wird eine Bestgerade ermittelt und der Korrelationskoeffizient berechnet (siehe Abbildung 21 und 22, Bestgerade für n=12 -----).

Für alle Patienten ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,46 bei der CH50 und von 0,54 bei der CIEP (siehe Tab. 10). Bei der Betrachtung der Abbildungen 21 und 22 fällt auf, daß jeweils zwei Wertepaare stark von den übrigen abweichen (In den Abbildungen mit einem Pfeil gekennzeichnet.). Sie zeichnen sich durch besonders hohe Porphyrinkonzentrationen von 16 bzw. 20 ug/dl im Serum aus. Nach Gigli

ist ab einer bestimmten Serumkonzentration kein weiterer Abfall der hämolytischen Aktivität mehr zu erwarten (69). Dies scheint auch auf diese beiden Werte zuzutreffen. Da jedoch auf eine lineare Beziehung zwischen Porphyrinkonzentration und C3-Spaltung bzw. Abfall der hämolytischen Aktivität untersucht werden soll, werden sie bei der folgenden Berechnung nicht mehr berücksichtigt. In Spalte 5 und 6 der Tabelle 10 sind die Werte der verbleibenden 10 Patienten mit einer Serumkonzentration von weniger als 15 $\mu\text{g/dl}$ eingetragen. Wie man der Tabelle entnehmen kann ergeben sich nun Korrelationskoeffizienten von 0,85 bei der CH50 und von 0,93 bei der CIEP. Die daraus resultierenden Bestgeraden sind in den Abbildungen 21 und 22 als eine durchgehende Linie eingezeichnet.

Tab. 10: Korrelation zwischen Porphyrinspiegel und C3-Spaltung bzw. Abfall der hämolytischen Aktivität nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA.

Nr.	PP ($\mu\text{g/dl}$)	CH50	CIEP	CH50	CIEP
1	0,5	14,7	8,2	14,7	8,2
2	9,3	35,3	17,0	35,3	27,0
3	3,6	25,7	10,0	25,7	10,0
4	4,3	38,9	18,2	38,9	18,2
5	0,6	12,8	5,1	12,8	5,1
6	0,5	30,0	7,6	30,0	7,6
7	16,0	34,3	15,5	-	-
8	4,0	42,1	24,0	42,1	24,0
9	10,0	37,2	21,8	-	-
10	9,7	61,8	32,5	61,8	32,5
11	6,1	42,5	23,7	42,5	23,7
12	10,7	65,4	29,7	65,4	29,7
Σ	85,3	440,7	223,3	369,2	186,0
$\bar{x}$	7,1	36,7	18,6	36,9	18,6
σ	$\pm 6,3$	$\pm 15,8$	$\pm 9,3$		
	R	0,46	0,54	0,85	0,93
	m	1,2	0,81	3,8	2,4
	b	28,3	12,9	18,1	6,7

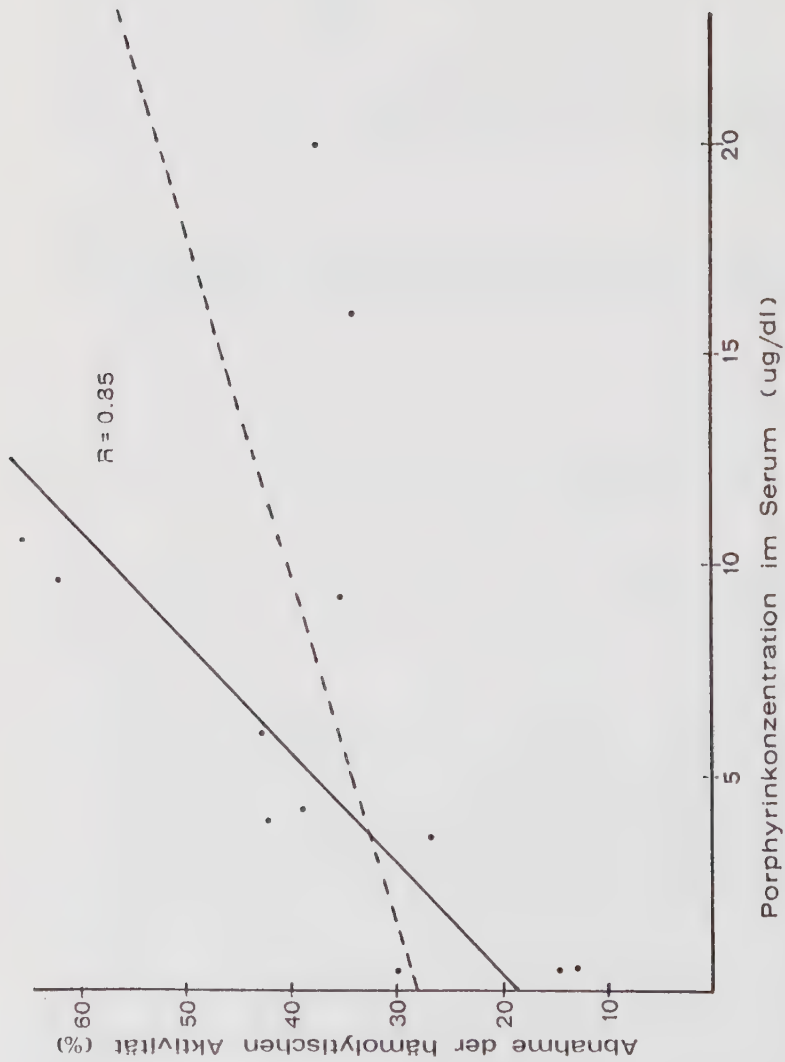


Abb. 21: Korrelation zwischen Porphyrinspiegel im Serum und Abnahme der hämolytischen Aktivität nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

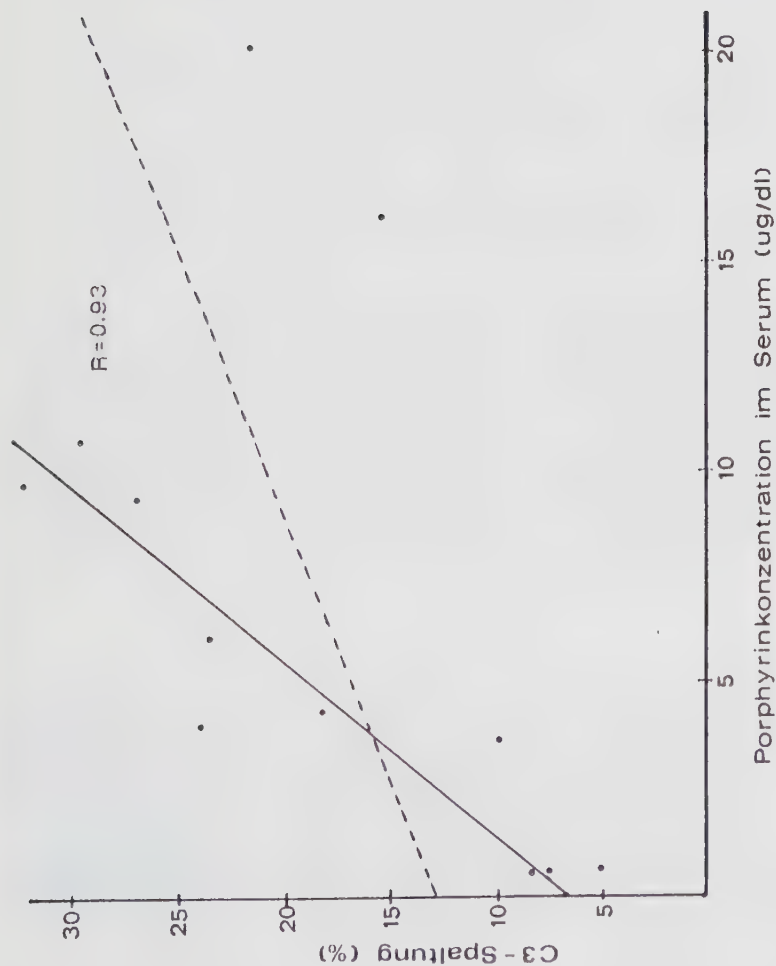


Abb. 22: Korrelation zwischen Porphyrinspiegel im Serum und C3-Spaltung nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

3.1.5. Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Komplementaktivierung C3 und C4 nach phototoxischer Komplementaktivierung

Im Serum eines Patienten mit EPP und in Normalserum, dem Protoporphyrin in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt worden war, wurden nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA die Proteinkonzentrationen der Komplementkomponenten C3 und C4 mittels der radialen Immundiffusion nach Mancini bestimmt. Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob sich die phototoxische Komplementaktivierung mit dieser Routineuntersuchung ebenfalls erfassen läßt.

Wie Tabelle 11 zeigt, lagen die Proteinkonzentrationen von C3 und C4 im Normalbereich und wiesen auch bei unterschiedlichen Porphyrinkonzentrationen und Bestrahlungsdosen lediglich uncharakteristische Schwankungen auf, die noch innerhalb des Fehlerintervalls der Methode von +/- 15 % lagen. Man kann somit feststellen, daß es mittels der radialen Immundiffusion nach Mancini nicht möglich ist, eine Aussage über den Aktivitätszustand der Komplementkomponenten C3 und C4 zu machen.

Tab. 11: Proteinkonzentrationen von C3 und C4 im Serum eines Patienten mit EPP nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA und im Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,3-10 ug/ml Serum) nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.
Normalwerte: C3 = 50 - 120 mg/dl
C4 = 20 - 50 mg/dl

Serum	Bestrahlung	C3 (mg/dl)	C4 (mg/dl)
Nr. 12	-	71	39
Nr. 12	5 J/cm ² UVA	93	43
Nr. 12	10 J/cm ² UVA	78	37
Nr. 12	50 J/cm ² UVA	80	36
NHS	50 J/cm ² UVA	81	47
NHS + 0,3 ug PP/ml	"	74	46
NHS + 0,6 ug PP/ml	"	81	41
NHS + 1,2 ug PP/ml	"	74	46
NHS + 2,5 ug PP/ml	"	74	43
NHS + 5,0 ug PP/ml	"	76	42
NHS + 10,0 ug PP/ml	"	80	45

3.2. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen

3.2.1. Abnahme der hämolytischen Komplementaktivierung CH50 und Auftreten von C3-Spaltprodukten in bestrahltem Normalserum nach Zusatz von Protoporphyrin (PP)

Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben wurde zu Normalserum PP in unterschiedlichen Konzentrationen (0,3-10 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben, mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt und Abnahme der hämolytischen Aktivität und C3-Spaltung bestimmt. Das Ergebnis der Immunelektrophorese zeigt die Abbildung 23. Man kann deutlich erkennen, daß es mit steigender Protoporphyrinkonzentration im Serum zu einem vermehrtem Auftreten von C3-Spaltprodukten kommt.

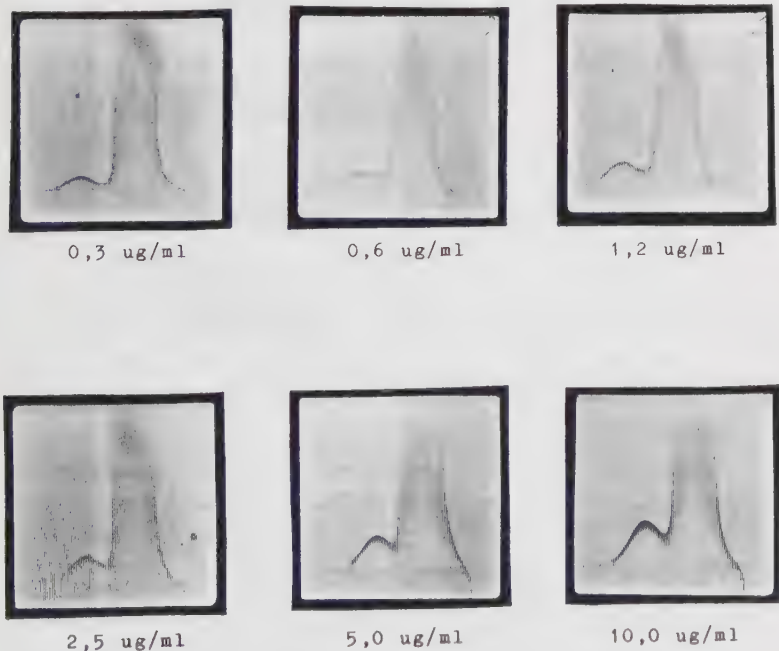


Abb. 23: C3-Spaltung in Normalserum nach Zusatz von PP in Konzentrationen von 0,6-10 $\mu\text{g/ml}$ und Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA

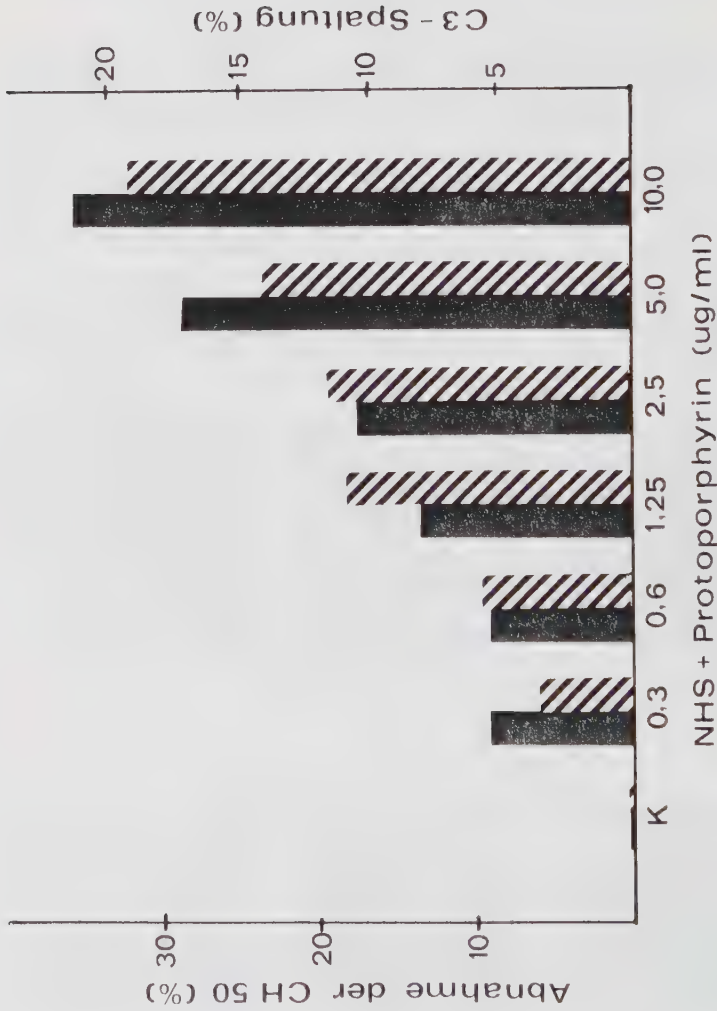


Abb. 24: Abfall der hämolysischen Aktivität (■) und C3-Spaltung (▨) in Serum von Normalpersonen nach Zusatz von PP in Konzentration von 0,3 µg/ml bis 10 µg/ml und Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

Tabelle 12: Abfall der hämolytischen Aktivität und C3-Spaltung in Serum von Normalpersonen nach Zusatz von Protoporphyrin in unterschiedlichen Konzentrationen und Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA

PP (ug/ml)	CH50	ΔCH50	CH50%	C3-Spaltung %
0	170	0	0	0 = Kontrolle
0,3	155	15	8,8	3,5
0,6	155	15	8,8	5,6
1,2	145	25	14,7	10,9
2,5	140	30	17,6	11,7
5,0	120	50	29,4	14,0
10,0	110	60	35,3	19,2
Σ(n=6)	825	195	114,6	64,9
$\bar{x}$	138	33	19,1	10,8
δ	±19	±19	±11,0	±5,7
R	0,96			0,92
m	2,8			1,4
b	9,8			6,2

Es wird daraufhin untersucht, ob eine lineare Korrelation zwischen den Parametern Serumporphyrinkonzentration und Komplementaktivierung besteht. Der Abfall der hämolytischen Aktivität bzw. der Grad der C3-Spaltung werden als Funktion der PP-Serumkonzentration in ein Koordinatensystem eingetragen (siehe Abb. 25 und 26). Die Werte für die Steigung und den y-Achsen Schnittpunkt der Bestgeraden sind der Tabelle 12 zu entnehmen, ebenso die Korrelationskoeffizienten. Sie betragen 0,92 für die gekreuzte Immunelektrophorese und 0,96 für den hämolytischen Assay.

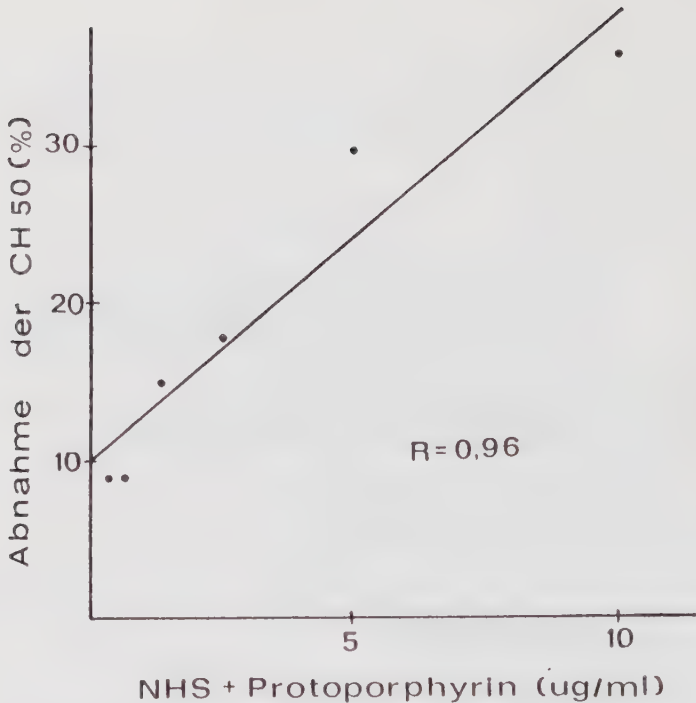


Abb. 25: Lineare Beziehung zwischen PP-Konzentration im Serum und Abfall der hämolytischen Aktivität nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA (Korrelationskoeffizient $R = 0,96$).

3.2.2. UV-induzierte Komplementveränderungen im Normalserum nach Zusatz von vorbestrahlten Protoporphyrin

Mit der in Kapitel 2.2.2. beschriebenen Methode sollte untersucht werden ob Protoporphyrin durch eine Vorbestrahlung mit 100 J/cm^2 UVA seine phototoxische Wirkung auf das Komplementsystem verliert. Unbehandeltes PP und PP, das mit 100 J/cm^2 UVA vorbestrahlt war, wurde in einer Endkonzentration von 10 ug/ml Normalserum zugesetzt. Anschließend wurden beiden Proben mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt. Lichtgeschützte Serumproben gleicher Zusammensetzung dienten als Kontrolle.

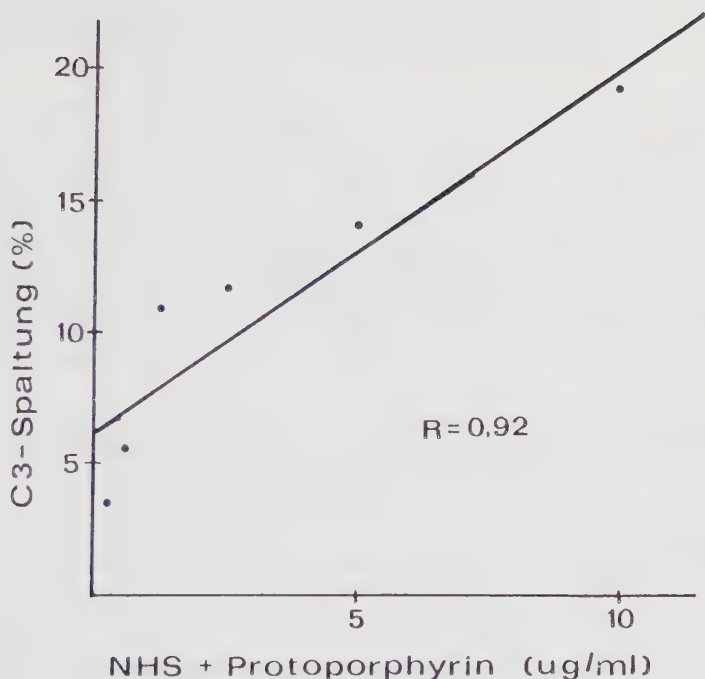


Abb. 26: Lineare Beziehung zwischen PP-Konzentration im Serum und C3-Spaltung nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA (Korrelationskoeffizient $R = 0,92$).

Tabelle 13 zeigt, daß die hämolytische Aktivität in der Probe mit vorbehandeltem PP nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA um 27 % und in der Probe mit unbehandeltem PP um 39 % abnimmt. Entsprechend liegt auch die C3-Spaltung nach UVA-Einwirkung in der Serumprobe mit vorbestrahltem PP mit 11 % niedriger als in der Probe mit unbehandeltem PP mit 16 %. Bei den lichtgeschützten Kontrollen kam es zu keiner Komplementaktivierung. Man kann daraus erkennen, daß durch eine Vorbestrahlung die phototoxische Wirkung von PP abgeschwächt aber unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht aufgehoben werden kann.

Tab. 13: Abnahme der hämolytischen Aktivität und C3-Spaltung in Normalserum nach Zusatz von vorbestrahltem und unbehandeltem PP nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

Serum	Bestrahlung	CH50	CH50	CH50%	C3-Spaltung
NS+PP vorbestrahlt	lichtgeschützt	165	-	-	-
NS+PP unbehandelt	lichtgeschützt	165	-	-	-
NS+PP vorbestrahlt	50 J/cm ² UVA	120	45	27,3	11,1
NS+PP unbehandelt	50 J/cm ² UVA	100	65	39,4	16,1

3.2.3. Einfluß des Chelatbildners EDTA auf die UV-induzierte Komplementaktivierung durch Protoporphyrin

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die phototoxische Komplementaktivierung durch PP in vitro durch den Chelatbildner EDTA gehemmt werden kann. EDTA blockiert durch seine Bindung an Calcium- und Magnesium-Ionen den klassischen und den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems (35, 91). Wie in Kapitel 2.2.2. angegeben wurde Normalserum mit PP versetzt (Endkonzentration 10 µg/dl), und mit oder ohne Zusatz von EDTA (Endkonzentration 30 mM) anschließend mit 50 J/cm² UVA bestrahlt. Als Kontrollen dienten eine lichtgeschützte Serumprobe gleicher Zusammensetzung und bestrahltes Normalserum, welches lediglich EDTA enthielt.

Tabelle 14 zeigt, daß die C3-Spaltung nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA in der Probe, die nur PP enthält, 19 % beträgt, nach Zusatz von EDTA jedoch nur noch 6 %. Dieser Wert liegt nur geringfügig über der Kontrolle mit 4 %. Dieses Ergebnis zeigt, daß die durch PP und UVA-Bestrahlung induzierte C3-Spaltung durch EDTA gehemmt werden kann.

Tab. 14: C3-Spaltung nach Zusatz von PP (Endkonzentration 10 $\mu\text{g/dl}$) und 30 mM EDTA zu Normalserum nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA.

Serum	Bestrahlung	C3-Spaltung
NS + EDTA + PP	lichtgeschützt	-
NS + EDTA	50 J/cm^2 UVA	4,1
NS + EDTA + PP	50 J/cm^2 UVA	6,2
NS + PP	50 J/cm^2 UVA	19,8

3.3. Einfluß therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung

3.3.1. Untersuchung im Serum von Patienten mit EPP unter Therapie mit Carotinoiden

Um die mögliche therapeutische Wirkung von Carotinoiden bei EPP zu überprüfen, wurde die Wirkung von beta-Carotin auf die phototoxische Komplementaktivierung untersucht. Zehn der zwölf Patienten mit EPP standen zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Therapie, wobei neun ein Kombinationspräparat aus beta-Carotin und Canthaxantin in einer Dosierung von 50 bis 100 mg pro Tag erhielten. Ein Patient erhielt ausschließlich beta-Carotin (150 mg pro Tag). 3 Patienten wurden zusätzlich mit Chloroquin (2x125 mg pro Woche) behandelt.

Die Ergebnisse der beta Carotin- und Canthaxantinbestimmung im Serum der behandelten Patienten mittels der HPLC-Methode sind in Tabelle 15 aufgeführt. Gleichzeitig sind in Tabelle 15 die Porphyrinkonzentrationen, der Abfall der hämolytischen Aktivität und die C3-Spaltung nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA angegeben. Es zeigt sich, daß keine Korrelation zwischen dem beta-Carotinspiegel und der Porphyrinkonzentration besteht ($R = 0,22$). Ebenso wenig korreliert die Carotinoidkonzentration im Serum mit dem Ausmaß der UVA-induzierten Komplementveränderungen.

Tab. 15: C3-Spaltung und Abnahme der hämolytischen Aktivität bei 10 Patienten mit EPP unter Carotinoidtherapie nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

Therapie	PP (ug/dl)	b-Carotin (ug/l)	Canthaxantin (ug/l)	CH50%	C3-Spaltung
b-Carotin	6,1	6655	-	42,5	23,7
b-Carotin	9,3	470	50	35,3	27,0
+ Canthaxantin	4,3	3345	2200	38,9	18,2
	0,5	550	280	30,0	7,6
	10,0	1605	360	34,3	15,5
	4,0	1855	1250	42,1	24,0
	20,0	5195	980	37,2	21,8
b-Carotin	0,5	3940	2200	14,7	8,2
+ Canthaxantin	3,6	410	-	25,7	10,0
+ Chloroquin	0,6	2740	18200	12,8	5,1
	64,9	26765		313,5	161,1
	6,5	2677		31,4	16,1
	±6,7	±2123		±10,6	± 8,0
R	0,22		0,18		0,25
m	69		0,9 x 10 ³		0,9 x 10 ³
b	2230		28,9		13,6

Bei der Patientin Nr. 12 E.B. konnte sowohl vor Therapiebeginn als auch nach sechswöchiger Therapie mit beta-Carotin in einer Dosierung von 150 mg pro Tag Blut entnommen werden. Wie Tabelle 16 zeigt, lag der beta-Carotinspiegel von Therapie bei 120 ug/l und erreichte nach Therapie 6330 ug/l. In beiden Serumproben wurde nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA die C3-Spaltung bestimmt. Die Tabelle 16 zeigt, daß kein Unterschied zwischen der UV-induzierten C3-Spaltung vor und während der Therapie besteht.

Tab. 16: C3-Spaltung bei der Patientin Nr. 12 (E.B.) vor und nach Therapie mit beta-Carotin und Bestrahlung mit 1, 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

	vor Therapie	nach Therapie
UVA-Dosis	C3-Spaltung	C3-Spaltung
1J	7,2	4,4
5J	13,6	15,6
10J	18,4	16,4
50J	29,7	29,3
K	0	0

3.3.2. Untersuchung in Seren von Normalpersonen in vitro nach Zusatz von beta-Carotin

Ein freiwilliger Proband unterzog sich einer sechswöchigen Therapie mit beta-Carotin in einer Dosierung von 100 ml pro Tag. Die Carotinoidkonzentration im Serum betrug vor Therapiebeginn 285 ug/l und nach Therapie 3635 ug/l. Nach Zusatz von Protoporphyrin (Endkonzentration 10 ug/ml) wurden beide Serumproben mit 50 J/cm² UVA bestrahlt und die C3-Spaltung mit der CIEP bestimmt. Als Kontrollen dienten lichtgeschützte Serumproben gleicher Zusammensetzung und mit 50 J/cm² UVA bestrahltes Serum ohne Zusatz von PP. Wie Tabelle 17 zeigt beträgt die C3-Spaltung in beiden Serumproben nach Bestrahlung 20 %. Sowohl in der lichtgeschützten als auch in der bestrahlten Kontrolle kommt es zu keiner C3-Spaltung.

In einem weiteren Versuch wurde zu Normaleerum beta-Carotin in einer Endkonzentration von 10 ug/ml und 20 ug/ml direkt zugegeben. Beide Serumproben wurden wie oben angegeben mit PP versetzt (Endkonzentration 10 ug/ml) und mit 50 J/cm² UVA bestrahlt.

Wie Tabelle 18 zeigt, ist die C3-Spaltung nach Bestrahlung in den beta-Carotinhaltigen Seren selbst in der hohen Konzentration von 20 ug/ml im gleichen Ausmaß nachweisbar wie in dem Kontrollserum, das kein beta-Carotin enthält. Auch diese invitro Versuche zeigen daher, daß beta-Carotin in

Normalserum, welches mit PP versetzt ist, keinen Einfluß auf die UV-induzierte Komplementaktivierung hat.

Tab. 17: C3-Spaltung im Serum einer mit beta-Carotin behandelten Normalperson nach Zusatz von PP und Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA

Serum	Bestrahlung	beta-Carotin (ug/l)	C3-Spaltung
NS+PP	lichtgeschützte Kontrolle	-	0
NS	50 J/cm ² UVA	-	3,8
NS+PP, vor Therapie	50 J/cm ² UVA	285	20,3
NS+PP, nach Therapie	50 J/cm ² UVA	3635	19,6

Tab. 18: C3-Spaltung in porphyrinämischen Normalserum nach Zusatz von beta-Carotin und Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

Serum	Bestrahlung	C3-Spaltung
NS+PP	lichtgeschützte Kontrolle	0
NS+PP	50 J/cm ² UVA	19,2
NS+PP+beta-Carotin (10ug/ml)	50 J/cm ² UVA	18,7
NS+PP+beta-Carotin (20ug/ml)	50 J/cm ² UVA	18,3

4. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Protoporphyrin und langwelligem UV-Licht auf das Komplementsystem untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Seren von Patienten mit Erythropoetischer Protoporphyririe (EPP), sowie in Seren von Normalpersonen nach Zusatz von Protoporphyrin. Das Patientengut bestand aus 12 Personen mit EPP im Durchschnittsalter von 33 Jahren (von 14 bis 62 Jahre). 2 der 12 Patienten waren zur Zeit der Blutentnahme ohne Therapie. Von den restlichen 10 erhielten vier Patienten 50 mg, vier 75 mg und zwei 100 mg beta-Carotin/Canthaxantin pro Tag. Drei wurden zusätzlich mit 250 mg Chloroquin pro Woche behandelt.

Die Serumproben wurden mit einer UVA-Hochleistungslichtquelle (UVA-Sun 5000) bestrahlt, die ausschließlich Energie im Wellenlängenbereich von 300 bis 460 nm emittiert, mit Maximum zwischen 360 und 390 nm (89). Somit wurde die gesamte Absorptionsbande der Porphyrinmoleküle erfaßt, welche im Bereich von 380 bis 420 nm liegt (siehe Abb. 1). Die Bestrahlungsdosen sollten in einem möglichst physiologischen Bereich liegen. Da an einem sonnenreichen Tag eine Strahlungsenergie von 100 J/cm^2 UVA gemessen werden kann, von der 45 % durch die Epidermis dringt (30), wurden Bestrahlungsdosen von 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA gewählt.

Die Wirkung von Protoporphyrin und langwelligem UV-Licht auf das Komplementsystem wurde anhand zweier Parameter verfolgt:

1. Abnahme der Gesamtkomplementaktivität im Serum mit Hilfe eines hämolytischen Assays nach der Methode von Rapp und Borsos (96), und
2. Auftreten von C3-Spaltprodukten in der zweidimensionalen gekreuzten Immunelektrophorese nach einer Modifikation der Methode von Laurell (61).

Die Ergebnisse zeigen, daß in allen Patientenseren nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 ein deutlicher Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität von durchschnittlich 37 % eintrat. In Seren von Normalpersonen dagegen kam es unter gleichen Versuchsbedingungen nur zu einem geringen Abfall von 12 %, der vermutlich auf unspezifische thermische Einwirkung auf Komplementproteine während des Bestrahlungsvor-

gangs zurückzuführen ist. Der mit der CH50 gemessene Komplementverbrauch nahm proportional mit steigender Bestrahlungsdosis von 5, 10 und 50 J/cm² UVA zu (siehe Tab. 5 und Abb. 16). Der Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität war bei gleicher Bestrahlungsdosis von 50 J/cm² UVA von Patient zu Patient unterschiedlich stark ausgeprägt und reichte von 12,8 % bis 65,4 %.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde die Protoporphyrinkonzentration im Serum der Patienten bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß 3 der 12 Patienten eine noch grenzwertig normale Protoporphyrinkonzentration von 0,5 ug/dl im Serum hatten. Bei diesen 3 Patienten wurde eine durchschnittliche Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität von nur 19 % gemessen, was noch in den oberen Normbereich fällt, während die Patienten mit Porphyrinkonzentrationen über 0,5 ug/dl (3,6-20 ug/dl) eine signifikante CH50-Abnahme von durchschnittlich 44 % aufwiesen. Dieses Ergebnis zeigt, daß die UV-induzierte Komplementaktivierung auch von der Porphyrinkonzentration im Serum der Patienten abhängig ist. Wie Tabelle 10 und Abbildung 21 und 22 zeigen, beträgt der Korrelationskoeffizient nach linearer Regression für diese beiden Parameter bei den 12 Patienten $R = 0,46$, was eher gegen eine lineare Abhängigkeit spricht. Lim et al. weisen darauf hin, daß bei hohen Porphyrinkonzentrationen im Serum keine lineare Proportionalität zum Abfall der hämolytischen Aktivität gegeben ist (69). Läßt man daher die beiden Patienten mit den extrem hohen Porphyrinkonzentrationen von 16 ug/dl und 20 ug/dl im Serum unberücksichtigt, so ergibt sich für die restlichen 10 Wertepaare ein Korrelationskoeffizient von $R = 0,85$. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Arbeiten von Gigli et al. und zeigt, daß im Bereich von 0 bis 10 ug/dl eine lineare Korrelation zwischen Porphyrinkonzentration im Serum und Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität besteht (40). Für den Bereich über 10 ug/dl liegen für eine sichere Interpretation nicht genügend Meßwerte vor, doch kann man vermuten, daß sich bei steigender Porphyrinkonzentration der Abfall der hämolytischen Aktivität asymptotisch dem Maximalwert von 100 % nähert.

Mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese und Verwendung eines Antiserums gegen C3c wurde in den bestrahlten Patientenserum die Freisetzung dieses Spaltproduktes und damit

indirekt die proteolytische C3-Spaltung, welche die wichtigste Stufe der Komplementkaskade darstellt, gemessen. Dabei wurde der prozentuale Anteil des C3c Spaltproduktes an der Gesamtproteinmenge von C3 im Serum semiquantitativ ermittelt (siehe 2.1.4.). Der mit dieser Methode bestimmte C3c-Anteil betrug bei den 3 Patienten mit grenzwertig erhöhten Serum-porphyrinkonzentrationen um 0,5 $\mu\text{g/dl}$ nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA durchschnittlich 7 %. Dieser Wert lag kaum über dem C3c-Anteil von 4,7 % $\pm$ 2,8 %, der im Serum von 6 Normalpersonen nach UV-Bestrahlung ermittelt wurde. Seren von Patienten mit erhöhtem Porphyrinspiegel zeigten dagegen einen C3c-Anteil von 10-27 % (Mittelwert 23 %). Für Patienten mit einer Porphyrinkonzentration bis 10 $\mu\text{g/dl}$ im Serum ergab sich hierbei eine lineare Korrelation von $R = 0,93$ zwischen Porphyrinkonzentration und C3c Anfall nach UV-Bestrahlung.

Wie Tabelle 7 und Abbildung 18 zeigen, kam es auch mit steigender Bestrahlungsdosis von 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA zu einem proportionalen Anstieg des C3c-Anteils was den Zusammenhang zwischen C3-Spaltung und Bestrahlungsdosis zeigt.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte die phototoxische Komplementaktivierung durch Zusatz von Protoporphyrin in verschiedenen Konzentrationen zu Seren gesunder Personen und anschließender Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA in vitro reproduziert werden. Auch hier veränderte sich die C3-Spaltung und die hämolytische Gesamtkomplementaktivität CH50 proportional zu der verabreichten Protoporphyrindosis, wie die Abbildung 24 zeigt. Es wurden Korrelationskoeffizienten von 0,92 für die CIEP und 0,96 für die CH50 berechnet. Auffallend war allerdings, daß zur Auslösung einer zu den EPP-Patienten vergleichbaren Komplementaktivierung weit höhere Porphyrinkonzentrationen im Serum nötig waren. Um bei gleicher Strahlendosis einen gleich starken Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität zu erreichen wie in einem Patientenserum war eine 200-fach höhere Protoporphyrindosis erforderlich. Dies liegt zum größten Teil wohl an der schlechten Löslichkeit des verwendeten Protoporphyrins in wässrigem Medium.

Bei der Gegenüberstellung beider Methoden ergab sich bei Berücksichtigung aller in bestrahlten Patientenseren gemessenen Werte ein Korrelation von $R = 0,85$ zwischen CH50

Abfall und C3c-Anstieg. Dies bedeutet, daß die Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität eng gekoppelt ist mit dem Auftreten von C3c-Fragmenten. Der Nachweis von C3c kann weiterhin als ein indirekter Hinweis auf die Freisetzung von C3a gewertet werden. C3a entsteht sowohl auf dem klassischen als auch auf dem alternativen Aktivierungsweg durch Spaltung von C3. C3a ist ein hormonähnliches Peptid (Anaphylatoxin), welches permeabilitätssteigernd wirkt, glatte Muskulatur kontrahiert, und Histamin aus Mastzellen und Basophilen freisetzt (22, 64, 86, 113). Gleichzeitig wird durch die proteolytische Spaltung von C3 das C3b-Spaltstück freigesetzt, das die Bildung eines neuen Enzymkomplexes C4b2a3b (C5-Konvertase) ermöglicht, der auf C5 einwirkt und dieses spaltet (108). Dabei entsteht ein weiteres Fragment C5a, das wie C3a anaphylatoxisch und zusätzlich chemotaktisch wirkt (109). Lim et al. konnten zeigen, daß die Bestrahlung mit 405 nm Licht von Normalserum, das Uroporphyrin enthält (67), bzw. von Seren von Patienten mit EPP (69) zur Freisetzung von chemotaktischer Aktivität führt. Die Autoren konnten weiter zeigen, daß die Aktivierung wahrscheinlich C5a-abhängig ist. Es wird daher diskutiert, daß die Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a im Serum unter Lichteinwirkung von pathophysiologischer Bedeutung für die phototoxischen Reaktion bei Patienten mit EPP ist. Möglicherweise begünstigen diese Anaphylatoxine die ausgeprägte Ödembildung, die Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten und die Degranulation von Mastzellen (47, 52), wie sie in belichteter Haut bei EPP beobachtet wird. Auch der Immunfluoreszenzoptische Nachweis von Komplementfaktoren (C1q, C4, C3c, C5 und C9) in Kombination mit Immunglobulinen und Plasmaproteinen in dermalen Kapillärwänden befallener Haut könnte für eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese der Hautveränderungen bei EPP sprechen (8, 29, 47). Wie Tabelle 13 zeigt, führte die Vorbestrahlung von Protoporphyrin mit 100 J/cm^2 UVA zu einer partiellen Hemmung sowohl der C3-Spaltung als auch des Abfalls der hämolytischen Aktivität. Lim und Gigli konnten in einem ähnlichen Versuch sogar die komplementaktivierende Wirkung von Porphyrinen durch Vorbestrahlung mit UVA vollständig aufheben (66). Vermutlich können die Porphyrinmoleküle nur in einem kurzfristigen angeregten Zustand mit dem Komplementsystem reagieren, und verlieren durch die Vorbestrahlung mit UVA durch Abgabe von Energie einen Teil ihrer phototoxischen Potenz.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die phototoxische Komplementaktivierung über die klassische oder alternative Kaskade abläuft, oder ob die Aktivierung unspezifisch ist. Es wurde der Chelatbildner EDTA (30 mM) zu Normalserum gegeben, das Protoporphyrin in einer Konzentration von 10 µg/ml enthielt. EDTA bindet sowohl die für eine stabilen C1qrs Komplex notwendigen Ca^{2+} -Ionen (114) als auch die für die Funktion der C3-Konvertase wichtigen Mg^{2+} -Ionen (35, 91) und blockiert somit klassischen und alternativen Aktivierungsweg. Die Tabelle 14 zeigt, daß es in EDTA-haltigem Normalserum trotz Zusatz von Protoporphyrin in hoher Konzentration zu einer völligen Blockierung der Wirkung von Protoporphyrin und UV-Licht auf die C3-Spaltung kommt. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die durch Protoporphyrin vermittelte phototoxische Komplementaktivierung auf einem der beiden bekannten Aktivierungswege erfolgt. Auch Lim und Gigli nehmen an, daß die Freisetzung chemotaktischer Aktivität in uroporphyrinhaltigem Serum an den klassischen Aktivierungsweg gebunden ist (68). Diese Autoren konnten zeigen, daß es sowohl im Serum von Patienten mit EPP als auch in Normalserum, dem Protoporphyrin zugesetzt worden war, nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 405 nm zu einer Abnahme der hämolytischen Titer der Komplementfaktoren C1, C2 und C4 kam, die Bestandteile des klassischen Aktivierungswegs sind (38). In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß von beta-Carotin auf die phototoxische Reaktion bei Patienten mit EPP untersucht. Beta-Carotin (C40H56) und das ebenfalls therapeutisch verwendete Diketo-beta-Carotin Canthaxantin (C40H52O2) sind Provitamine und werden im menschlichen Organismus in Retinol umgewandelt (7). Dieser Prozeß läuft allerdings nur solange ab, bis die physiologisch günstigsten Serumspiegel an Retinol erreicht sind (95).

1956 konnten Siatrom et al. zeigen, daß Carotinoide als Schutzfaktoren bei photodynamischen Prozessen in dem Bakterium *Rhodospseudomonas spheroides* wirken (102). Diese Beobachtung wurde durch weitere Untersuchungen an anderen Bakterien, Algen und höheren Pflanzen bestätigt (4, 58, 60, 74, 75). 1964 zeigte Mathews, daß Mäuse, die beta-Carotin erhielten, in einem signifikant höheren Prozentsatz eine Behandlung mit Hämatoporphyrin und UV-Bestrahlung überlebten, als Mäuse, die kein beta-Carotin erhielten (73). 1970 berichteten Mathews-Roth et al. erstmals über eine erfolgreiche

Behandlung einer Patientin mit EPP mit beta-Carotin (77). Die therapeutische Wirksamkeit wurde in verschiedenen klinischen Studien an einem größeren Patientengut hinreichend belegt (2, 10, 11, 20, 28, 46, 49, 53, 59, 65, 78, 79, 85, 110, 111, 116). Andere Gruppen wie Corbett et al. konnten jedoch keine protektive Wirkung von beta-Carotin auf die lichtinduzierte phototoxische Reaktion bei Patienten mit EPP feststellen (23). Allerdings lag die tägliche beta-Carotin Dosis in dieser Untersuchung auch niedriger als allgemein empfohlen wird. Der Mechanismus der Schutzwirkung von beta-Carotin bei Patienten mit EPP ist noch nicht vollkommen geklärt. Denkbar wäre eine Wirkung als Lichtfilter, da Carotinoide in der Epidermis abgelagert werden. Das Absorptionsmaximum von beta-Carotin liegt bei 457 nm und 485 nm, das von Canthaxantin bei 469 nm (44). Das bei Photodermatosen symptomauslösend UV-Licht liegt im Bereich um 400 nm (70). Swanbeck und Wennersten konnten jedoch zeigen, daß beta-Carotin nur eine geringe Schutzwirkung auf die durch Protoporphyrin induzierte Photohämolyse hat, wenn es als Filtersubstanz verwendet wird (106). Ebenso wenig hat beta-Carotin einen direkten Einfluß auf den Porphyrinspiegel bei EPP (77, 78, 79).

Bereits 1960 fanden Claes et al., daß Carotinoidpigmente in der Alge *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit von der Länge des Chromophors vor photosensitiver Oxidation schützen (21). Foote et al. zeigten, daß Carotinoide mit neun und mehr konjugierten Doppelbindungen als effektive Fänger von Sauerstoffradikalen fungieren (34). Beta-Carotin und Canthaxantin besitzen jeweils elf solcher Doppelbindungen. Heute werden zwei mögliche Mechanismen für die photoprotektive Wirkung von beta-Carotin bei EPP diskutiert:

1. Abfangen toxischer Radikale

Durch Bestrahlung werden Porphyrine in einen angeregten Zustand versetzt, und es entstehen toxisch wirksame Radikale (Triplet-Zustand). Diese Radikale werden durch beta-Carotin neutralisiert (3, 19, 36, 55, 80, 115).

2. Entgiftung des Sauerstoffs im Singulettzustand

Durch angeregtes Protoporphyrin im Triplet-Zustand gerät molekularer Sauerstoff in einen aktivierten, reaktionsfreu-

digen Zustand (Singulett-Zustand) und bewirkt zum Beispiel eine Oxidation von membranbildenden Lipiden. Hieraus resultiert eine massive Schädigung zellulärer und subzellulärer Membranen. Beta-Carotin ist in der Lage Sauerstoff im Singulettzustand zu neutralisieren und das Zustandekommen der Schadeffekte zu verhindern (33, 34, 76, 84). Miao et al. konnten zeigen, daß beta-Carotin vor Photohämolysen schützt (83).

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob beta-Carotin außerdem einen direkten Einfluß auf die phototoxische Komplementaktivierung in vitro hat. Dazu wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt:

1. 2 Patienten ohne Therapie
2. 7 Patienten, die ausschließlich mit Carotinoiden behandelt wurden
3. 3 Patienten, die Carotinoide und Chloroquin erhielten.

Die Tabellen 6 und 8 und die Abbildungen 17 und 19 zeigen, daß sich die Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität und das Ausmaß der C3-Spaltung deutlich unterschied. C3-Spaltung und Komplementverbrauch war in der Gruppe ohne Therapie fast doppelt so hoch wie in der Gruppe, die ausschließlich mit Carotinoiden behandelt wurde. Die 3 Patienten, die kombiniert mit Carotinoiden und Chloroquin behandelt wurden zeigen den niedrigsten Aktivitätsverlust und die geringste C3-Spaltung. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die unterschiedlich ausgeprägten, UV induzierten Komplementveränderungen in den Seren dieser 3 Patientengruppen, durch die unterschiedlichen Porphyrinspiegel bedingt sind.

Zum Ausschluß einer hemmenden Wirkung von Carotinoiden wurde die beta-Carotin Konzentration im Serum der Patienten bestimmt und untersucht, ob die Höhe des Carotinspiegels einen Einfluß auf die UVA-induzierten Komplementveränderungen und den Porphyrinspiegel im Serum hat. Wie Tabelle 15 zeigt, besteht keine Korrelation zwischen beta-Carotin und Porphyrin-Konzentration im Serum der zehn behandelten Patienten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Mathews (83). Ebenso wenig korreliert die Carotinoidkonzentration mit dem UV-bedingten Abfall der hämolytischen Aktivität und der C3-Spaltung. In einem weiteren Versuch zeigte sich, daß die UVA-induzierte C3-Spaltung im Serum einer Patientin nach

sechswöchiger Therapie mit beta-Carotin genauso ausgeprägt war wie vor Therapiebeginn (siehe Tabelle 16). Dieses Ergebnis wurde durch zwei Zusatzversuche bestätigt. Tabelle 17 zeigt, daß die C3-Spaltung im Serum einer Normalperson, die sich einer sechswöchigen beta-Carotintherapie unterzog, nach Zusatz von Protoporphyrin und Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA vor und nach der Therapie gleich war. Aus Tabelle 18 ist ersichtlich, daß Zusatz von beta-Carotin in unterschiedlichen Konzentrationen zu porphyrinämischen Serum die UVA-induzierte C3-Spaltung nicht beeinflußt. Die Ergebnisse dieser Versuche geben keinen Hinweis auf einen hemmenden Einfluß von Carotinoiden auf das Ausmaß der phototoxischen Komplementaktivierung bei EPP.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können folgende Mechanismen an der Pathogenese der entzündlichen Hautveränderungen bei Patienten mit EPP beteiligt sein. Durch UVA-Licht der Wellenlänge 400 nm angeregtes Protoporphyrin führt entweder direkt oder über die Bildung von Sauerstoffradikalen zu einer Schädigung von Zellen und Basalmembranbestandteilen im Bereich der Haut. Daneben wird durch die UVA-Einstrahlung im dermalen Kapillarnetz eine Aktivierung des Komplementsystems ausgelöst, die proportional dem Serumporphyrinspiegel und der Bestrahlungsdosis ist.

Durch die Komplementaktivierung werden hochwirksame Anaphylatoxine freigesetzt, die entzündliche Veränderungen im Bereich der Gefäße und der unmittelbaren Umgebung begünstigen. Es kann vermutet werden, daß mit beta-Carotin vorwiegend die zellschädigende Bildung freier Radikale und Sauerstoffradikale nicht jedoch die Wirkung photoaktiver Porphyrinmoleküle auf das Komplementsystem verhindert werden kann. Dies würde die klinische Beobachtung erklären, daß mit Carotinoiden in den meisten Fällen eine vorübergehende erhöhte Lichttoleranz von Patienten mit EPP erreicht werden kann, die jedoch nicht von Dauer ist bzw. durch sehr hohe Lichtdosen unterbrochen werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von UV-Licht (320-400 nm) auf das Komplementsystem im Serum von zwölf Patienten mit EPP und im Serum von Normalpersonen nach Zusatz von Protoporphyrin in vitro untersucht. Als Parameter für Veränderungen im Komplementsystem wurde funktionell die hämolytische Gesamtkomplementaktivität und das Auftreten von C3-Spaltprodukten immunoelektrophoretisch bestimmt.

In den Patientenseren kam es nach Bestrahlung mit UVA-Dosen, die auch unter natürlichen Bedingungen die Haut erreichen in vitro zu einem gegenüber Normalseren signifikanten Abfall der hämolytischen Aktivität mit Auftreten von C3c-Spaltprodukten. Sowohl hämolytischer Aktivitätsverlust als auch C3-Spaltung waren direkt proportional zur Porphyrinkonzentration im Serum und der eingestrahlten UVA-Dosis. Es konnte nachgewiesen werden, daß zwischen den Ergebnissen beider Meßmethoden eine hohe Korrelation besteht. Der gleiche Effekt auf das Komplementsystem konnte in Normalseren durch Zusatz von Protoporphyrin und anschließender Bestrahlung mit UVA ausgelöst werden.

Durch Vorbestrahlung mit 100 J/cm^2 UVA konnte die komplementaktivierende Wirkung von Protoporphyrin deutlich reduziert werden. Dies läßt vermuten, daß Protoporphyrin nur in einem kurzfristig angeregten Zustand mit dem Komplementsystem reagiert und durch Vorbestrahlung mit UVA durch Abgabe von Energie einen Teil seiner phototoxischen Potenz verliert. Durch Zusatz des Chelatbildners EDTA konnte die UVA-induzierte Komplementaktivierung in porphyrinämischen Serum fast vollständig verhindert werden. Dies zeigt, daß die phototoxische Komplementaktivierung calciumabhängig ist und somit möglicherweise über die sogenannte klassische Komplementkaskade abläuft.

Bei zehn Patienten mit EPP, die mit Carotinoiden behandelt wurden, konnte nachgewiesen werden, daß beta-Carotin keinen unmittelbaren Einfluß auf die phototoxische Komplementaktivierung in vitro hat. Auch in Normalserum führte beta-Carotin zu keiner Reduktion der komplementaktivierenden Wirkung von Protoporphyrin und UVA-Licht.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde eine Beteiligung des Komplementsystems am Pathomechanismus der lichtinduzierten Hauterscheinungen bei EPP diskutiert. Es kann angenommen werden, daß lichtaktivierte Porphyrine sowohl direkt zellschädigend wirken als auch durch eine Aktivierung des Komplementsystems entzündliche Vorgänge auslösen können, welche die klinisch und histologisch nachweisbaren Veränderungen bei EPP erklären. Carotinoide, deren lichtprotektive Wirkung bei EPP therapeutisch ausgenützt wird, haben nach den Ergebnissen dieser Arbeit keinen direkten Einfluß auf die UVA-induzierte Komplementaktivierung durch Protoporphyrin.

6. LITERATUR

- 1 Allison AC et al (1966): Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization.
Nature 209: 874-878
- 2 Anderson CR (1972): Erythropoietic protoporphyria.
Arch. Dermatol. 106: 412-413
- 3 Anderson SM, Krinsky NI (1973): The inhibition of photosensitized oxidations in liposomes by carotenoid pigments and free radical quenchers.
Fed Proc 32: 562
- 4 Anderson IC; Robertson DS (1960): Role of carotinoids in protecting chlorophyll from photodestruction.
Plant Physiol 35: 531-534
- 5 Anton-Lamprecht I; Meyer B (1970): Zur Ultrastruktur der Haut bei Protoporphyrinämie.
Dermatologica 141: 76
- 6 Augener W, Grey HM, Cooper NR, Müller-Eberhard JH (1971): The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with Cl.
Immunochemistry 8: 1011-1020
- 7 Auterhoff H: Vitamine in: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie 1980, S. 567.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- 8 Baart de la Faille H: Erythropoietic protoporphyria, a photodermatosis.
Oosthoek, Utrecht/Schelteema & Holkema, Amsterdam 1975
- 9 Baart de la Faille H: Erythropoetische Protoporphyrie. In Korting GW (Hrsg.): Dermatologie in Praxis und Klinik (1979) 38.69-38.82
Thieme Verlag Stuttgart

- 10 Baart de la Faille H, Suurmond D, Went LN, van Steveninck J, Schothorst AA (1972): Beta-Carotene as a treatment for photohypersensitivity due to erythropoietic protoporphyria.
Dermatologica (Basel) 145: 389-394
- 11 Beckert E, Metz J (1974): Zur Beta-Carotin-Behandlung der erythropoetischen Protoporphyrrie.
Hautarzt 25: 195-196
- 12 Bickers DR, Pathak MA, Magnus IA: The Porphyrins. In Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf IK, Freedberg IM, Austen KF: *Dermatology in general medicine*.
New York: Mc Graw Hill: 1072-1105
- 13 Bloomer JR, Bonkowsky HL, Ebert PS, Mahoney MJ (1976): Inheritance in protoporphyria comparison of haem synthetase activity in skin fibroblasts with clinical features.
Lancet 2: 226-228
- 14 Bodaness RS, Chan PC (1977): Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide.
J Biol Chem 252: 8554-8560
- 15 Borsos T, Rapp JH, Mayer MM (1961): Studies on the second component of complement.
J Immunol 87: 310-321
- 16 Bottomly SS, Tanaka M, Everett MA (1975): Diminished erythroid ferrochelatase activity in protoporphyrias.
J Lab Clin Med 86:136
- 17 Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (1984): Protoporphyria erythropoetica in: *Dermatologie und Venerologie* Springer Verlag, Berlin Heidelberg: 786-788
- 18 Braun-Falco O: Pathologische Veränderungen an Grundsubstanz, Kollagen und Elastica. In Jadassohn J (Hrsg.): *Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten*. Bd. I/2 (1964).
Springer Verlag Berlin: 519-651

- 19 Chantrell SJ, Mc Auliffe DA, Munn RW et al (1977):
Excited states of protoporphyrin-IX-dimethylester: reac-
tion of the triplet with carotenoids.
J Chem Soc (Faraday I) 73: 858-865
- 20 Chapel TA, Stewart RH, Webster SB (1972): Erythropoietic
protoporphyria- report of a case successfully treated
with beta-carotene.
Arch Dermatol 105: 572-573
- 21 Claes H (1960): Interaction between chlorophyll and
carotenes with different chromophoric groups.
Biochem Biophys Res Commun 3: 585-590
- 22 Cochrane CG, Müller-Eberhard HJ, Aikin BS (1968): The
derivation of two distinct anaphylatoxin activities from
the third and fifth components of human complement.
J Exp Med 127: 371-386
- 23 Corbett MF, Herxheimer A, Magnus IA, Ramsay CA, Kobza
Black A (1977): The long term treatment with beta-
carotene in erythropoietic protoporphyria: a controlled
trial.
Br J Dermatol 97: 655-662
- 24 Cripps DJ, Mac Eachern WN (1971): Hepatic and erythro-
poietic protoporphyria delta-aminolevulinic acid synthe-
tase; fluorescence and microspectrophotometric study.
Arch Pathol 91: 497-505
- 25 Cripps DJ, Scheure PJ (1965): Hepatobiliary changes in
erythropoietic protoporphyria.
Arch Pathol 80: 500
- 26 Doss M: Porphyrins and porphyrin precursors in: Curtius
HC, Roth M (Hrsg.): Clinical Biochemistry, Principles
and Methods (1974).
De Gruyter Berlin: 1323
- 27 Doss M et al: Principal Methods in Clinical Biocheme-
stry. Bd. 2 Curtius und Roth; Walter de Gruyter Verlag
1973/74 13.23-13.71.

- 28 Eales L (1978): The effects of canthaxantin on the photocutaneous manifestations of porphyria.
S Afr Med J 54: 1050-1052
- 29 Eppstein JH, Trufanelli DL, Epstein WL (1973): Cutaneous changes in the porphyrias- a microscopic study.
Arch Dermatol 107: 689-698
- 30 Everett MA, Yeagers E, Sayre RM, Olson RL (1966): Penetration of epidermis by ultraviolet rays.
Photochem Photobiol 5: 533-542
- 31 Fearon DT, Austen KF (1977): Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanism.
Proc Natl Acad Sci 74: 1683-1687
- 32 Fearon DT, Ruddy S, Schur H, McCabe WR (1975): Activation of the properdin pathway of complement in patients with gram-negative bacteremia.
N Engl J Med 292: 937-940
- 33 Foote CS, Chang YC, Denny RW (1970): Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection.
J Am Chem Soc 92: 5216-5218
- 34 Foote CS, Denny RW (1968): Chemistry of singlet oxygen, VII. Quenching by beta-carotene.
J Am Chem Soc 90: 6233-6235
- 35 Frank MM, Rupp HJ, Borsos T (1964): Studies on the terminal steps of immune hemolysis. I. Inhibition by trisodium-ethylenediaminetetraacetate (EDTA).
J Immunol 93: 409-418
- 36 Fujimori E, Tavla M (1966): Light induced electron transfer between chlorophyllin and hydroxichinone and the effect of oxygen and beta-carotene.
Photochem Photobiol 5: 877-887

- 37 Gigli I, Austen KF (1969): Fluid phase destruction of C4 by C1: Its enhancement and inhibition by homologous and heterologous C4.
J Exp Med 129: 679-680
- 38 Gigli I, Lim HW (19): Release of proinflammatory peptides by complement in porphyrin-induced photosensitivity.
- 39 Gigli I, Nelson RA (1968): Complement dependent immune phagocytosis.
Exp Cell Res 51: 45-67
- 40 Gigli I, Schothorst AA, Soter NA, Pathak MA (1980): Erythropoietic protoporphyria: Photoactivation of the complement system.
J Clin Invest 66: 517-522
- 41 Girotti AW (1976): Photodynamic action of Protoporphyrin IX on human erythrocytes: cross linking of membrane proteins.
Biochem Biophys Res Commun 72: 1367-1374
- 42 De Goeij AFPM, Christianse K, van Steveninck J (1975): Decreased haem synthetase activity in blood cells of patients with erythropoietic protoporphyria.
Eur J Clin Invest 5: 397-400
- 43 Goerz G: Porphyrinkrankheiten in Korting: GW (Hrsg.): Dermatologie in Praxis und Klinik (1979).
Thieme Verlag Stuttgart: 38.48-38.51
- 44 Goldstein BD, Harber LC (1972): Erythropoietic protoporphyria: Lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis.
J Clin Invest 51: 892-902
- 45 Gordon W (1963): The detection of photosensitivity in porphyria using filtered sunlight.
S Afr J Lab Clin Med 36: 29-57
- 46 Gschnait F, Wolff K (1974): Die erythropoetische Protoporphyrrie.
Hautarzt 25: 72-80

- 47 Gschnait F, Wolff K, Konrad K (1975): Erythropoietic protoporphyria- submicroscopic events during the acute photosensitivity flare.
Br J Derm 92: 545-557
- 48 Haeger-Aronson B, Krook G (1966): Erythropoietic proporphyrin: a study of known cases in Sweden.
Acta Med Scand 179: 48
- 49 Haeger-Aronson B, Krook G, Abdully M (1979): Oral carotenoids for photohypersensitivity in patients with erythropoietic protoporphyria, polymorphous light eruptions and lupus erythematoses discoides.
Int J Dermatol 18: 73-82
- 50 Harber LC, Bickers DR (1975): The Porphyrins: basic science aspects, clinical diagnosis and management.
Year Book of Dermatology: 9-47
- 51 Hochstein P, Ernstner L (1964): Microsomal peroxidation of lipids and its possible role in cellular injury, in: AVS De Reuck, J. Snight (Hrsg.): CIBA Foundation Symposium on cellular Injury.
Boston, Little Brown S. 123-146
- 52 Hönigsmann H, Gschnait F, Konrad K, Stingl G, Wolff K (1976): Mouse model for protoporphyria. III. Experimental production of chronic erythropoietic protoporphyria-like skin lesions.
J Invest Dermatol 66: 188-195
- 53 Ippen H, Goerz G, Botsch C (1974): Photoprotection in porphyrias and the role of phlebotomy. In: Pathak MA, Harber LC, Seiji M (Hrsg.): Sunlight and Man: Normal and Abnormal Photobiologic Responses.
Univ of Tokyo Press, Tokyo, S. 655-658
- 54 Keining E, Braun-Falco O: Dermatologie und Venerologie.
J. Lehmanns Verlag München 1969, S. 704-706
- 55 Kellog EW, Fridovich I (1975): Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system.
J Biol Chem 250: 8812-8817

- 56 Kolb WP, Haxby JA, Arroyave CM, Müller-Eberhard HJ (1972): Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement.
J Exp Med 135: 549-566
- 57 Kosenow WA, Treibs A (1953): Lichtüberempfindlichkeit und Porphyrinämie.
Z Kinderheilk 73: 82-88
- 58 Krinsky NI (1968): The protective function of carotenoid pigments. In: Giese AC (Hrsg.): Photophyiology Vol. 3. Academic Press, New York: 123-195
- 59 Krook G, Haeger-Aronson B (1974): Erythropoietic protoporphyria and its treatment with beta-carotene.
Acta Dermatol Venerol (Stockholm) 54: 39-44
- 60 Kunisawa R, Stanier RY (1958): Studies on the role of carotenoid pigments in a chemoheterotrophic bacterium, *Cornynebacterium poinsettiae*.
Arch Mikrosk 31: 146-156
- 61 Laurell CB (1965): Antigen-antibody crossed elektrophoresis.
Anal Biochem 10: 358-361
- 62 De Leo VA, Poh-Fitzpatrick MB, Mathews-Roth MM, Harber LC (1976): Erythropoietic protoporphyria, ten years experience.
Am J Med 60: 8
- 63 Leon MA (1958): Quantitative studies on the properdin-complement system. III. Kinetics of the reaction between C3 and the properdin zymosan complex.
J Immunol 81: 23-28
- 64 Lepow IH, Da Silva W, Eisele JW: Nature and biological properties of human anaphylatoxin, in: Austen KF, Becker EL (Hrsg.): Biochemistry of the acute allergic reaction. Blackwell, Oxford S. 265
- 65 Lewis MB (1972): Effect of beta-carotene on serum vitamin A levels in erythropoietic protoporphyria.
Australas J Dermatol 13: 75-78

- 66 Lim HW, Gigli I (1981): Role of complement in porphyrin-induced photosensitivity.
J Invest Dermatol 76: 4-9
- 67 Lim HW, Perez HD, Goldstein IM, Gigli I (1981): Ultra-violet-A irradiation provokes generation of complement-derived proinflammatory peptides in human serum containing uroporphyrins. Clin Res 28: 476 A.
- 68 Lim HW, Perez HD, Goldstein IM, Gigli I (1981): Complement-derived chemotactic activity is generated in human serum containing Uroporphyrin after irradiation with 405 nm light.
J Clin Invest 67: 1072-1077
- 69 Lim HW, Perez HD, Poh-Fitzpatrick M, Goldstein IM, Gigli I (1981): Generation of chemotactic activity in serum from patients with erythropoietic protoporphyria and porphyria cutanea tarda.
- 70 Magnus IA et al. (1959): The action spectrum for skin lesions in porphyria cutanea tarda.
Lancet I: 912-914
- 71 Magnus IA, Jarrett A, Prankerd TAJ, Rimington C (1961): Erythropoietic protoporphyria. A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyriaemia.
Lancet II: 448-451
- 72 Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2: 235-254
- 73 Mathews MM (1964): Protective effect of beta-carotene against lethal photosensitization by hematoporphyrin.
Nature 184: 1862
- 74 Mathews MM, Sistrom WR (1959): Function of carotenoid pigments in non-photosynthetic bacteria.
Nature 184: 1892

- 75 Mathews MM, Siström WR (1960): The function of the carotenoid pigments of *Sarcoma lutea*.
Arch Mikrosk 35: 139-146
- 76 Mathews-Roth MM (1982): Photosensitization by porphyrins and prevention of photosensitization by carotenoids.
J Nat Cancer Inst 69: 279-285
- 77 Mathews-Roth MM, Pathak MA, Fitzpatrick TB et al. (1970): Beta-carotene as a photoprotective agent in erythropoietic protoporphyria.
N Engl J Med 282: 1231-1234
- 78 Mathews-Roth MM, Pathak MA, Fitzpatrick TB et al (1974): Beta-carotene as an oral photoprotective agent in erythropoietic protoporphyria.
JAMA 228: 1004-1008
- 79 Mathews-Roth MM, Pathak MA, Fitzpatrick TB et al. (1977): Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases.
Arch Dermatol 113: 1229-1232
- 80 Mathews-Roth MM, Wilson T, Fujimori E (1974): Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization.
Photochem Photobiol 19: 217-222
- 81 Mauzerall D, Feher G (1964): A study of the photoinduced porphyrin free radical by electron spin resonance.
Biochem Biophys Acta 79: 430-432
- 82 Meyer-Betz F (1913): Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und andere Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes.
Dtsch Arch Klin Med 112: 476-503
- 83 Miao LL, Mathews-Roth MM, Poh-Fitzpatrick MB (1979): Beta-carotene treatment and erythropoietic protoporphyria levels.
Arch Dermatol 115: 818

- 84 Moshell ON, Bjornson L (1975): Photoprotection in erythropoietic protoporphyria. Mechanism of photoprotection by beta-carotene.
J Invest Derm 68: 157-160
- 85 Moynahan EJ, Leppard B (1973): Erythropoietic protoporphyria.
Proc R Soc Med 66: 1085-1086
- 86 Müller-Eberhard HJ: The Molecular Basis of the biological activities of complement. In: The Harvey lectures, Series 66.
Academic Press, New York, S. 75
- 87 Müller-Eberhard HJ, Goetze O (1972): C3 proactivator convertase and its mode of action.
J Exp Med 135: 1003-1008
- 88 Müller-Eberhard HJ, Polley MH, Calcott MA (1967): Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and fourth components of human complement.
J Exp Med 125: 359-380
- 89 Mutzhas MF, Hölzle E, Hofmann C, Plewig G (1981): A new apparatus with high radiation energy between 320-460 nm, physical description and Dermatological applications.
J Invest Dermatol 76: 42-47
- 90 Nelson RA, Jensen J, Gigli I et al. (1966): Methods for the separation, purification and measurement of nine components of hemolytic complement in guinea serum.
Immunochemistry 3: 111-135
- 91 Osler AG, Mayer MM (1953): Studies of the role of Ca^{2+} and Mg^{2+} in complement fixation and immune hemolysis. III. The respective roles of Ca^{2+} and Mg^{2+} in immune hemolysis.
J Immunol 71: 374-381
- 92 Pfaffenbach G, Lamm M, Gigli I (1978): Activation of complement by mouse IgA immune-complexes.
Fed Proc 37: 1377

- 93 Pillemer L, Blum L, Pensky J, Lepow IH (1953): The requirement for magnesium ions in the inactivation of the third component of human complement (C3) by insoluble residues of yeast cells (zymosan).
J Immunol 71: 331-338
- 94 Polley MF, Müller-Eberhard HJ (1978): The second component of human complement: Its isolation, fragmentation by C1-Esterase and incorporation into C3 convertase.
J Exp Med 128: 533-551
- 95 Raab W (1983): Medizinische und erscheinungsmedizinische Anwendung von beta-Carotin und Canthaxantin.
Ärztl Kosmetologie 13: 93-131
- 96 Rapp HJ, Borsos T: Molecular Basis of Complement Action. Appleton, Century, Crofts, New York, 1970
- 97 Reed WB, Wuepper KD, Epstein IH, Redeker A, Simonson RJ, McKusick VA (1970): Erythropoietic protoporphyria.
JAMA 214: 1060-1066
- 98 Rimington C et al. (1967): Porphyria and photosensitivity.
Q J Med 36: 29-57
- 99 Ruddy S, Austen KF (1971): C3b-inactivator in man. II. Fragments produced by C3b-inactivator cleavage of cell-bound or fluid phase C3b.
J Immunol 107: 742-750
- 100 Ryan EA, Madill GT (1968): Electron microscopy of the skin in erythropoietic protoporphyria.
Br J Derm 80: 561-570
- 101 Schmidt H, Snitker G, Thomsen K, Lintrup J (1974): Erythropoietic protoporphyria-a clinical study based on 29 cases in 14 families.
Arch Dermatol 110: 58
- 102 Sistrom WR, Friffith M, Stanier RY (1956): The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids.
J Cell Comp Physiol 48: 473-515

- 103 Slater TA, Riley PA (1966): Photosensitization and lysosomal damage.
Nature 209: 151-154
- 104 Spikes JD (1975): Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitizers.
Am NY Acad Sci 244: 496-508
- 105 Suurmond D (1969): Some aspects of erythropoietic protoporphyria in the Netherlands.
Dermatologica 138: 303
- 106 Swanbeck G, Wannersten G (1970): Effect of beta-carotene on photohemolysis.
Acta Dermatovener (Stockholm) 53: 283-289
- 107 Torinuki W, Miura T, Seiji M (1980): Lysosome destruction and lipoperoxidase formation due to active oxygen generated from haematoporphyrin and UV-irradiation.
Br J Dermatol 102: 17-27
- 108 Vogt W, Schmidt G, von Buttlar B, Dieminger L (1978): A new function of the activated third component of complement: Binding to C5, an essential step for C5 activation.
Immunology 34: 29-40
- 109 Ward PA (1967): A plasmin-split fragment of C3 as a new chemotactic factor.
J Exp Med 126: 189-206
- 110 Wannersten G, Swanbeck G (1974): Treatment of light sensitivity with carotenoids.
Acta Derm Venerol (Stockholm) 54: 491
- 111 Wiskemann A (1974): Topical and systemic photoprotection against porphyrins. In: Pathak MA, Harber LC, Seiji M (Hrsg.): Sunlight and Man: Normal and Abnormal Photobiologic Responses.
Univ of Tokyo Press, Tokyo S. 669-676
- 112 Wiskemann A, Wulf K (1959): Zur Lichtprovokation der Porphyrin-Dermatosen.
Arch Klin Exp Dermatol 209: 454-465

- 113 Wuepper KD, Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ, Stoughton RB (1972): Cutaneous responses to human C3 anaphylatoxin in man.
Clin Exp Immunol 11: 13-20
- 114 Wurx L, Ratuooff DD, Pillemer L (1954): Studies on the mechanism of inactivation of human complement by plasmin and by antigen-antibody aggregates. I. The requirement for a factor resembling C1 and the role of Ca^{2+} .
J Immunol 73: 146-155
- 115 Yamane T, Lamola AA (1973): Red blood cell lysis induced by a product of singlet oxygen and cholesterol. In: Abstracts of the American Society for Photobiology. Sarasoto, Florida, S. 66
- 116 Zaynoun ST, Hunter JAA, Darby FJ et al (1977): The treatment of erythropoietic protoporphyria: experience with beta-carotene.
Br J Dermatol 97: 663-668

Danksagung

Herrn Prof. Dr.med. Dr.h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeit an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Herrn OA Dr.med. Meurer möchte ich für die Vorbereitung und Förderung der Arbeit sowie für die freundliche Beratung herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr.med. Goerz und Herrn Bolsen bedanke ich mich für die Zusendung des größten Teils der Patientenseren und für eine Reihe wertvoller Auskünfte.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Nau und Frau Heilmann für die labortechnische Unterstützung.

Lebenslauf

Am 7.6.1957 wurde ich, Arno Erich Bernhard Weiler, als erstes Kind des Diplom-Kaufmanns Wilhelm Weiler und seiner Ehefrau Hildegard, geborene Laßmann, in Dernbach/Westerwaldkreis geboren.

Von 1963-1968 besuchte ich die Volksschule in Wirges und wechselte anschließend auf das Staatliche Gymnasium Montabaur über, wo ich im Frühjahr 1977 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1977/78 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes. Im Sommersemester 1981 setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München fort, wo ich im Mai 1984 nach Bestehen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit dem Wahlfach Dermatologie die Approbation als Arzt erhielt. Seit dem 1. Oktober 1984 leiste ich meinen Wehrdienst ab und bin zur Zeit als Truppenarzt des Luftlandefernmeldelehrbataillons 9 in Starnberg tätig.

